

INAUGURAL – DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht – Karls – Universität
Heidelberg

Vorgelegt von
Diplom-Biochemiker Peter Koch
Aus: Sasbach (Baden-Württemberg)
Tag der mündlichen Prüfung:

Thema:

**Fluoreszenzmikroskopische
Untersuchung zum retroviralen Eintritt
auf Einzelpartikelebene**

Gutachter: Prof. Dr. Hans-Georg Kräusslich
PD. Dr. Friedrich Frischknecht

An meine Eltern für mein bisheriges
und an Juliane für mein künftiges Leben

Zusammenfassung:

HIV-1 ist in den letzten drei Jahrzehnten im Fokus intensiver Forschung gewesen. Trotzdem sind die frühen Schritte des Zelleintritts noch nicht im Detail verstanden. Die Fusion und die direkt nachfolgenden Schritte der Virusinfektion sind mit den herkömmlichen biochemischen und virologischen Ensemblemessungen nur auf Kosten der Zeitauflösung und durch die Verwendung artifizieller Synchronisationsmethoden zu adressieren.

In dieser Arbeit wird die virale Fusion mittels *live cell imaging* auf Einzelpartikelebene untersucht. Dazu war die Etablierung eines auf Fluoreszenzsignalen beruhenden Indikators für Fusion nötig. Um dies zu erreichen wurden bereits vor dieser Arbeit an inneren Partikelstrukturen fluoreszenzmarkierte HIV-Partikel mit einer zusätzlichen Fluoreszenzmarkierung in der Virusmembran versehen. Die Membranmarkierung sollte im Moment der Membranfusion an der zellulären Membran verbleiben und sich so von der ersten Fluoreszenzmarkierung trennen. Als effektive Membranmarkierungsmethode stellte sich die Pseudotypisierung der HIV-Partikel mit MLV.Env.YFP heraus. Gegenüber dem HIV-Hüllprotein besitzt das MLV-Hüllprotein eine hohe Fusogenität, was für die Detektion von Fusionen einzelner Partikel ein Vorteil ist. Um die Detektionswahrscheinlichkeit einzelner Fusionsereignisse weiter zu erhöhen, wurde ein neuer Versuchsaufbau in der Abteilung etabliert. Das gewählte Verfahren erlaubte die einfache Quantifizierung der Virus-Zell-Interaktionen. Nach ausführlicher Charakterisierung wurden mittels eines automatisierten Virustracking-Algorithmus mehr als 20.000 einzelne Partikel verfolgt und 28 Fusionen auf Einzelpartikelebene als Farbtrennungseignisse detektiert.

Um die frühen Ereignisse der Infektion besser zu verstehen, wurden die inneren Partikelstrukturen über unterschiedliche fluoreszenzmarkierte HIV-Proteine visualisiert. Das Verhalten der fluoreszenzmarkierten Proteine nach der Fusion wurde miteinander verglichen.

Es zeigte sich, dass Viren mit dem MLV-Hüllprotein effizient an der Plasmamembran fusionierten. Außerdem blieb das fluoreszenzmarkierte Matrix-Protein, von dem bislang angenommen wurde, dass es sich nach der Fusion schnell im Zytoplasma auflöst, über

längere Zeit als punktierte Struktur sichtbar. In unserem experimentellen System kann die Trennung der Matrix vom Viruskern auch erst Minuten nach der Fusion erfolgen.

Summary:

In the last decades HIV-1 has been the subject of intense research. However, the early steps of the viral cell entry are not yet fully understood. Established biochemical and virological methods are able to address viral fusion and subsequent steps of viral infection only at the costs of time resolution and by using methods that artificially synchronise the cell cycle.

Here, we study the viral fusion on a single particle level using *live cell imaging*. For this purpose a fusion indicator was developed relying on the fluorescent signals of single particles. An additional fluorescent label within the viral membrane was introduced into a previously fluorescently labelled HIV particles. When fusion occurs, this membrane label remains at the cellular membrane and is thereby separated from the first fluorescent particle marker. Pseudotyping of HIV particles with the MLV.Env.YFP turned out to be an efficient way to label the viral membrane.

Compared to HIV.Env, the MLV.Env is highly fusogenic thereby increasing the probability to detect single fusion events. To further enhance the detection probability a new assay protocol was established. The chosen procedure allowed the quantification of virus-cell interactions. After detailed assay characterisation more than 20.000 single particle tracks were analysed using an automated virus tracking algorithm. Based on fluorescent signal separation 28 fusion events were identified.

For a further characterisation of the early steps of viral infection the inner particle structure was visualised with different fluorescently tagged HIV proteins. The behaviour of the different viral markers after fusion was compared against each other. It turned out that MLV.Env particles fused at the plasma membrane efficiently. In addition, the fluorescently tagged viral Matrix protein remained visible as a punctuated structure beyond the moment of fusion. Currently it is believed that the MA proteins dilutes in the cytosol during or briefly after the fusion. We could show that the separation of MA from the particle core can be delayed for several minutes in our experimental setup.

I. Publikationen

II. Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung

1.1 HIV und AIDS.....	1
1.2 Retroviren	2
1.3 Der Aufbau von HIV	3
1.4 Der Replikationszyklus von HIV-1	5
1.5 Das Matrix-Protein	8
1.6 Das Virale Protein R.....	10
1.7 Das Integrase-Protein	11
1.8 Viruseintritt.....	11
1.9 Die HIV-Fusion	14
1.10 Uncoating	16
1.11 Darstellung der Fusion von Retroviren auf Einzelpartikelebene	16
1.12 Zielsetzung	19

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien.....	21
2.2 Verbrauchsmaterialien, Reagenzien und Kits	23
2.3 Puffer und Lösungen	24
2.4 Enzyme	26
2.5 DNS und Protein-Standardmarker	26
2.6 Antiseren	26
2.7 Verwendete Plasmide	27
2.8 Synthetische Oligonukleotide für PCR	29
2.9 Sterilisation	29
2.10 Bakterienkulturen	29
2.11 Bakterienstämme	30
2.12 Zelllinien	30
2.13 Nährmedien und Zusatzreagenzien.....	30
2.14 Technische Geräte.....	31
2.14.1 Allgemeine technische Geräte.....	31
2.14.2 Mikroskop	31
2.15 Software.....	32
2.15.1 Software für allgemeine Anwendungen	32
2.15.2 Automatisiertes Tracking von Viruspartikel	32
2.16 Molekularbiologische Methoden	33

2.16.1 Transformation von Bakterien	33
2.16.2 Präparation von Plasmid-DNS:	33
2.16.3 Photometrische DNS-Konzentrationsbestimmung	35
2.16.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)	35
2.16.5 DNS-Restriktion und Ligation	35
2.16.6 Elektrophoretische Separation von DNS	36
2.17 Plasmide	36
2.17.1 Klonierung von pCHIV.MA.mCherry. PR(-).Env(-)	37
2.17.2 Klonierung von MLV.Env.mCherry	37
2.17.3 Klonierung von MLV.Env.mCherry.H8R.....	37
2.18 Zellbiologische und virologische Methoden	37
2.18.1 Zellkultur.....	37
2.18.2 Cryokonservierung von Zelllinie	38
2.19 Biochemische Methoden.....	38
2.19.1 P24-ELISA.....	38
2.19.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
2.19.3 Westernblot	40
2.19.4 Viruspartikelproduktion und Aufreinigung.....	41
2.19.5 Verhältnis der Plasmide bei einer Transfektion	41
2.19.6 Mikroskopischer Viruseintrittversuch.....	42
2.19.7 Messung des Eindringvermögens von Viren in Zellen.....	43
2.19.8 Bestimmung der Transduktionseffizienz von Viruspartikeln mit dem lac-Z-Reportergen	43
2.19.9 Mikroskopische Charakterisierung der doppelt fluoreszenzmarkier- ten Viren.....	44
2.19.10 Fluoreszenzmarkierung der viralen Membran durch Verwendung von fluoreszenzmarkierten Lipiden.....	44
2.19.11 Markierung der viralen Membran durch Verwendung von Fluoro- phoren mit Hilfe von Membranankerpeptiden	45
.....	
3. Ergebnisse	
3.1 Fusionsdetektion	46
3.2 Strategien zur Fluoreszenzmarkierung der viralen Membran	48
3.2.1 Partikel mit fluoreszenzmarkierten Lipiden	48
3.2.2 Eintrittseffizienz GM1-markierter Partikel	51
3.2.3 Virus-Zell-Interaktion von GM1-markierten Partikeln	52
3.2.4 Zellvermittelte Lipidmarkierung.....	53
3.2.5 Verwendung von GPI-gebundenen Fluorophoren	53
3.3 Verwendung von MLV.Env Pseudotypen.....	57

3.3.1 Optimierung der Pseudotypisierung von MA.mCherry HIV-1 Partikeln mit MLV.Env.YFP	58
3.3.2 Markierungseffizienz von MLV.Env pseudotypisierten HIV-Partikeln mit anderen fluoreszenzmarkierten HIV Proteinen	60
3.4 Charakterisierung der Virus-Eintrittseffizienz für live cell imaging.....	62
3.5 Eintrittseffizienz vorgebundener Viren	65
3.6 Übertritt des viralen MLV:Env-Signals auf rezeptorpositive Zellen.....	67
3.7 Verlust des Env-Signals auf Einzelpartikelebene	69
3.8 Live cell imaging von Fusionsereignissen auf Einzelpartikelebene ...	71
3.9 MA-Signale nach der Fusion.....	78
3.10 Verhalten anderer viraler Strukturen nach der Fusion	79
3.11 Menge an Hüllprotein der fusionierenden Partikel	81
 4. Diskussion	
4.1 Etablierung einer Membranfärbung	83
4.1.1 Membranfärbung mittels fluoreszenzmarkierten Lipiden.....	84
4.1.2 Membranfärbung mittels fluoreszenzmarkierten Proteinen.....	85
4.2 Charakterisierung des Versuchsaufbaus zur Partikelanalyse	87
4.3 Plasmamembranfusion auf Einzelpartikelebene.....	90
4.4 Kinetik der Fusion.....	94
4.5 Häufigkeit der Fusion	95
4.6 MA und andere Virusmarker	97
4.7 Bewegungsassoziiierung der Partikel	100
 5. Ausblick.....	102
 Anhang	103
 Literaturverzeichnis	107
 Abbildungsverzeichnis	113
 Danksagung.....	114

Publikationen

Publikationen:

Peter Koch, Marko Lampe, William J. Godinez, Barbara Müller, Karl Rohr, Hans-Georg Kräusslich, Maik J. Lehmann (2009), „Visualizing fusion of pseudotyped HIV-1 particles in real time by live cell microscopy“, *Retrovirology*, 2009, 6():84.

Vorträge:

Peter Koch, Maik Lehmann, Marko Lampe, William Godinez, Barbara Müller, Karl Rohr, Hans-Georg Kräusslich, „Early entry events of MLV pseudotyped HIV-1 studied by live cell imaging“, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Virologie, Leipzig, 2009.

Peter Koch, Maik Lehmann, Marko Lampe, William Godinez, Barbara Müller, Karl Rohr, Hans-Georg Kräusslich, „Study of single viral fusion events using MLV pseudotyped HIV-1“, April Spring Meeting of the Collaborative Research Centre „Dynamics of Macromolecular Complexes in Biosynthetic Transport“, 2009.

Posterpräsentationen:

Peter Koch, Manon Eckhardt, Maria Anders, Melaku Adal, Katharina Stöhr, Marko Lampe, Hans-Georg Kräusslich, Dirk-Peter Herten, Barbara Müller. “SNAP-tagged HIV-1 derivatives as tools for the study of viral entry and egress”, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Virologie, Heidelberg, 2008, 6 (1):84.

Peter Koch, Marko Lampe, William Godinez, Barbara Müller, Karl Rohr, Hans-Georg Kräusslich, Maik J. Lehmann; „Visualising fusion of pseudotyped HIV-1 particles in real time by live cell microscopy“, *Retroviruses*, Cold Spring Harbour, 2009.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

((X))	Literaturangabe
α -	(Name) Antikörper gerichtet gegen (Name)
μ	Mikro
Abb.	Abbildung
AIDS	erworbenen Immundefizienz-Syndrom (<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>)
APS	Ammoniumperoxydisulfat
bp	Basenpaare
Bodipy	8-(4,6-Dichloropyrimidin-5-yl)
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CA	Kapsidprotein
C ₁₆	Alkylgruppe (Hexadecanyl-)
ca.	circa
Cer	Ceramid
CD	<i>Compact Disc</i>
CD(Nummer)	Unterscheidungsgruppe (<i>Complex of differentiation</i>)
CXCR-4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor-4
CCR-5	CC-Motiv-Chemokinrezeptor-5
cDNA	Komplementäre (<i>complementary</i>) DNA
CFP	Cyan-fluoreszierendes Protein (engl.: <i>cyan fluorescent protein</i>)
DHPE	1,2-Dihexa-Decanoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DOPS	1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-(Phospho-L-Serin)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIAV	<i>equine infectious anemia virus</i>
Env	Virales Hüllprotein, Genprodukt des viralen env-Gens
ESCRT	<i>endosomal sorting complex required for transport</i>
<i>et al.</i>	und andere
FIV	<i>feline immunodeficiency virus</i>
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
Gag	Genprodukt des viralen gag-Gens
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
GM1	Gangliosid
gp	Glykoprotein
h	Stunde(n) (bei Zeitangaben) oder human (Herkunft von Proteinen etc. – dem Wort vorangestellt)
HAART	Hochwirksame antiretrovirale Therapie (<i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immunodefizienz Virus
HR	<i>heptad repeat region</i>
HSV	Herpes Simplex Virus
I	Interaktion
IN	Integrase Protein von HIV-1
kb	Kilobasen
k	Kilo
Da	Dalton
l	Liter

Abkürzungsverzeichnis

L	<i>late</i>
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LTR	Endsequenzen des proviralen Genoms (engl.: <i>long terminal repeats</i>)
m	Milli
M (Einheit)	Molar (mol/l)
M	Membranbindung
MA	Matrixprotein
MES	2-(N-morpholin)ethansulfonsäure
MLV	Mäuse Leukämie Virus
min	Minute(n)
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
MVV	<i>maedi visna virus</i>
n	Nano
NBD	7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol
NC	Nukleokapsid
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phosphatidylethanolamine
PIC	Präintegrationskomplex
PIP ₂	Phosphoinositol-(3,4,)-Biphosphat
Pol	Polymerase
POPC	1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin
PR	Protease
PR(-)	inaktive Protease
Primer	Starter-Oligonukleotid (z.B. bei der PCR)
rel.	relative(s)
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Riverse Transkriptase
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n) in Graphen
SIV	Simian Immunodefizienz Virus
SU	<i>surface subunit</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Trisacetat/EDTA-Elektrophoresepuffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylamin
Tex	Texas Red (Fluorophor)
TM	Transmembrandomäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität (<i>Unit</i>)
Upm	Umdrehungen pro Minute
u.a.	unter anderem
v	Volumen
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
VSV-G	Glykoprotein des Vesikuläres Stomatitis Virus
Vpr	Virales Protein R
wt	Wildtyp
XFP	Fluoreszierendes Protein, ohne Festlegung auf eine bestimmte Wellenlänge, in der Regel bei der Beschreibung von Ergebnissen bei denen nicht immer dasselbe Fluorophor benutzt wurde
YFP	Gelb-fluoreszierendes Protein (<i>yellow fluorescent protein</i>)
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung:

Viren sind obligate Zellparasiten. Sie verfügen über keinen eigenen Stoffwechsel und sind auf die Maschinerie einer Wirtszelle angewiesen. Ihr Vermehrungszyklus lässt sich dabei in drei Phasen unterteilen: 1) Eintritts-, 2) Genomreplikations- und Assemblierungsphase, 3) Extrazelluläre Phase. Extrazelluläre Viruspartikel bestehen aus einem viralen Genom (RNS oder DNS), das von einem Kapsid umschlossen ist. Dieses kann wiederum bei einigen Virusfamilien (u.a. Retroviren) von einer zusätzlichen Membranhülle umgeben sein ((Flint, LW et al. 2004)). Die Virusinfektion beginnt mit der Bindung des Viruspartikels an Oberflächenrezeptoren der Wirtszelle. Das Virus tritt in die Zelle ein und durchläuft Entpackungsschritte (*uncoating*); bis das virale Genom an den Ort seiner Replikation gelangt. Dabei werden virale Proteine sowie das virale Genom unter Zuhilfenahme der Wirtszelle vervielfältigt und zu neuen Partikeln zusammengefügt.

Derzeit werden vom Internationalen Komitee der Virustaxonomie (*International Committee of Taxonomy of Viruses*, ICTV) 73 Virusfamilien gemäß ihrer genotypischen Eigenschaften unterschieden. Eine dieser Familien stellen die Retroviren (von **Reverse Transkriptase Onkoviren**) dar, zu denen die beiden hauptsächlich in dieser Arbeit untersuchten Viren, das Humane Immunodefizienz-Virus-1 (HIV) und das ekotrope Mäuse-Leukämie-Virus (*ecotropic murine leukemia virus*, MLV), gehören ((Fauquet, Mayo et al. 2005)).

1.1 HIV und AIDS

Die Ansteckung eines Menschen mit HIV-1 führt zu einer persistierenden, chronischen Infektion. Sie verursacht eine Störung des zellulären Immunsystems, die im Endstadium zu dem erworbenen Immundefizienz-Syndrom führt (**Acquired Immune Deficiency Syndrome**, AIDS¹). Die Infektion erfolgt in der Regel über sexuellen

¹ Im Organismus befällt HIV-1 hauptsächlich CD4-T-Zellen und vermehrt sich dort. In der Phase der akuten Virämie fällt die Zahl der CD4-T-Zellen ab, oft begleitet von einer Aktivierung von CD8-T-

Umgang mit infizierten Personen, direkten Blut-Blut Kontakt (Blutprodukte, mehrfacher Gebrauch von Injektionsbesteck) oder Mutter-Kind-Übertragung (unter der Geburt und über die Muttermilch). Dabei werden vornehmlich CD4-T-Zellen von dem Virus befallen, aber auch akzessorische Zellen und andere Körperzellen. Im Verlauf kommt es zu einem Verlust an CD4-Zellen und einer Störung der Immunantwort. Nach einer unterschiedlich langen Latenzphase führt der Virusbefall im Endstadium zu rezidivierenden opportunistischen Infektionen und Tumoren. Das Virus ist pandemisch verbreitet und hat weltweit etwa 39 Millionen Menschen infiziert ((www.rki.de/cln)).

Die weltweit bestehende AIDS-Problematik hat zu intensiver Forschung auf dem Gebiet des HI-Virus geführt und umfangreiche Erkenntnisse in der Virusmorphologie, -Replikation und -Diagnostik erzeugt. Mit den heute vorhandenen Behandlungsansätzen² der Infektion kann die Viruslast eines Infizierten stark reduziert werden. Das Immunsystem kann sich rekonstituieren. Doch existiert weder eine präventive Impfung noch gibt es Heilung, also die vollständige Eliminierung des Virus aus dem Körper eines infizierten Menschen.

1.2 Retroviren

Charakteristisches Merkmal der Familie der Retroviren ist die Reverse Transkriptase (RT), die das virale RNS-Genom in doppelsträngige DNS übersetzt. Die Retroviren werden in 7 Genera unterteilt, α -, β -, γ -, δ - und ε -Retroviren, Spuma- und Lentiviren (lat. *lentus*: langsam) ((Flint, LW et al. 2004)). Die beiden hier relevanten Retroviren gehören zu den γ -Retroviren (MLV) bzw. den Lentiviren (HIV-1).

Zellen. Meistens erholt sich die Zahl der CD4-T-Zellen fast auf Ausgangsniveau und die Viruslast des Patienten geht zurück. Diese beschwerdefreie Phase wird auch Latenzzeit genannt und kann mehrere Jahre dauern. Zwar bleibt die Viruslast niedrig, doch sinkt die Zahl der CD4-Zellen kontinuierlich. Auch andere Zelltypen wie z.B. CD4-positive Monozyten und Makrophagen werden infiziert und stellen bis heute ein therapeutisch schwer bis gar nicht zugängliches Virusreservoir dar.

In der Folge manifestiert sich das Vollbild von AIDS. Die Zahl der CD4-T-Zellen sinkt, was das Immunsystem der Befallenen entscheidend schwächt und anderen potentiellen Krankheitserregern den Befall des Infizierten ermöglicht. Unbehandelt führen diese sogenannten opportunistischen Infektionen in der Folge zum Tod.

² Für Infizierte gibt es durch die Einnahme von bestimmten anti-viral wirkenden Medikamenten die Möglichkeit, den Krankheitsverlauf zu verlangsamen. Standard ist derzeit die Kombinationstherapie HAART (*Highly Active Antiretroviral Therapy*). Dabei werden die inhibitorisch wirksamen Präparate verschiedener Wirkungsklassen (in der Regel zwei Reverse-Transkriptase-Inhibitoren und ein Proteaseinhibitor) verabreicht. Die regelmäßige Einnahme kann das Auftreten der AIDS-Symptome über Jahrzehnte hinauszögern.

HIV-1 wird weiter in die Gruppen M (*main*), N (*near*) und O (*outliner*) unterteilt, Gruppe M spaltet sich noch weiter in die Subtypen A-J. HIV-2 wird unterteilt in die Subtypen A-F. Ebenfalls der Gruppe der Lentiviren werden EIAV (*equine infectious anemia virus*), MVV (*maedi visna virus*), FIV (*feline immunodeficiency virus*) und SIV (*simian immunodeficiency virus*) mit nicht humaner Wirtsspezifität zugeordnet.

Das MLV befällt lymphatische Zellen der Maus und ist für Lymphome in dieser Tierart verantwortlich. Je nach Hüllprotein lassen sich zwei Gruppen unterteilen, die amphotropen MLVs, die auch Zellen anderer Spezies infizieren können, und die ekotropen Viren, welche auf den Mäuse-Kationischen-Aminosäuretransporter als zellulären Rezeptor angewiesen sind ((Coffin, Hughes et al. 1997)).

1.3 Der Aufbau von HIV

HIV besitzt ein ca. 9,2 kb großes, positivsträngiges RNA-Genom. Wie alle Retroviren trägt das Genom die drei Gene *gag*, *pol* und *env*, die für die Polyproteine Gag (für **G**ruppen-spezifisches **A**ntigen, Strukturproteine), Pol (für **P**olymerase, Integrase und Reverse Transkriptase (RT)) und Env (für Hüllprotein (*envelope*), Glycoproteine) kodieren ((Flint, LW et al. 2004)).

Als komplexes Lentivirus kodiert HIV neben Gag, Pol und Env zusätzlich für die regulatorischen Proteine Rev und Tat sowie für die akzessorischen Proteine Nef, Vif, Vpr und Vpu (Abb. 1.1). Flankiert werden die kodierenden Regionen von RNS-Sequenzen, welche Promotor- und *Enhancer*-Sequenzen enthalten.

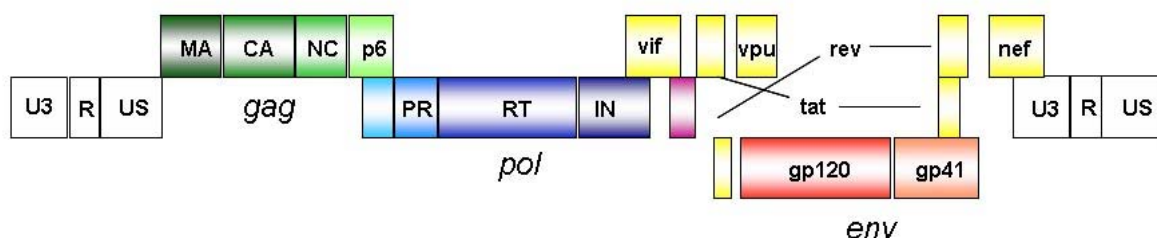


Abb. 1.1: Das offene Leseraster von HIV (nach (Mahender 2006)). Gagkomponenten in grün (MA, CA, NC, p6). Pol in blau (PR, RT, IN) und Env in rot (gp120, gp41). Akzessorische Proteine in gelb. Jeweils an den Enden befinden sich Promotor- und Enhancer-Sequenzen in weiß.

Im Viruspartikel befinden sich die Glykoproteine gp120 und gp41 als Env-Trimer in die Virusmembran. An die Innenseite der Virusmembran ist das Matrix-Protein gebunden. Das Kapsidprotein bildet eine kegelförmige Proteinkapsel. In ihrem Inneren befinden sich zwei RNS-Kopien des Genoms, welches von den Nukleokapsidproteinen gebunden wird. Außerdem befinden sich die Proteine IN, PR und RT dort (Abb. 1.2).

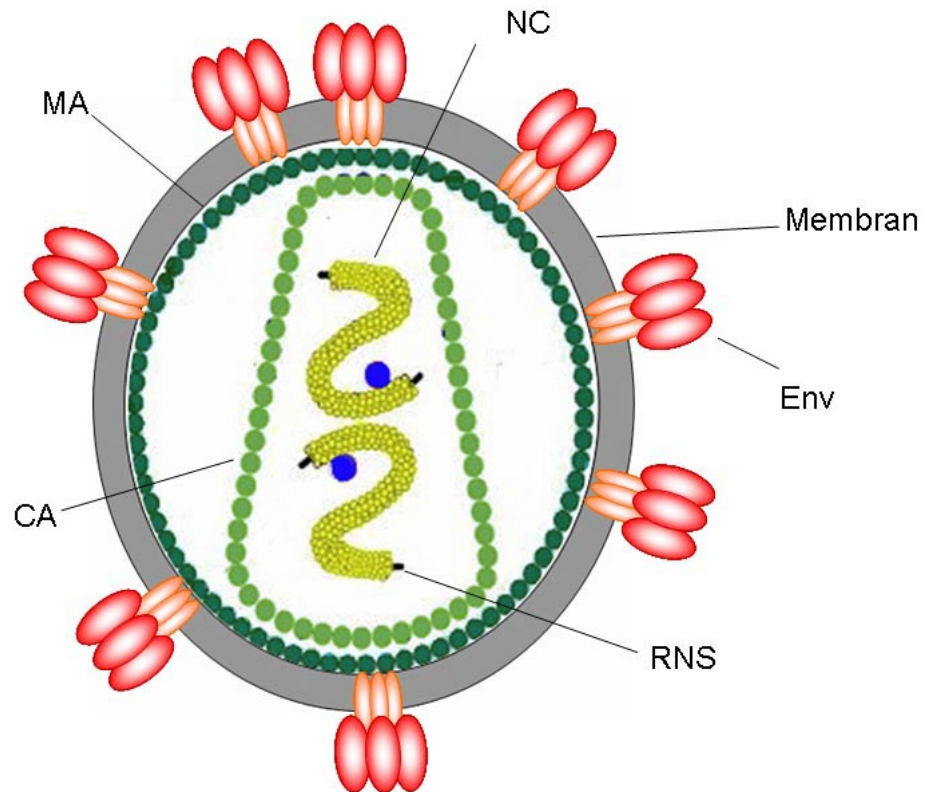


Abb. 1.2: Schematische Darstellung eines HIV-Partikels ((www.aids-sida.com)). (nach (Mahender 2006)). Gagkomponenten in grün (MA, CA, NC, p6). Pol in blau (PR, RT, IN) In der Membran (grau) befinden sich die Env-Moleküle (dunkelrot gp120, hellrot gp41). Das Matrix-Protein (dunkelgrün) bildet eine Schicht an der Innenseite der Membran. Das Kapsid wird von den Kapsidmolekülen (grün) gebildet als innere Hülle des viralen Genoms. Diese wird von Nukleokapsidmolekülen gebunden. Mit dem Genom assoziieren auch Integrase und Reverse Transkriptase (blau).

1.4 Der Replikationszyklus von HIV-1

Eine HIV-1-Infektion beginnt mit dem Eindringen des Virus in seine Wirtszelle (Abb. 1.3). Dabei interagiert das trimere Hüllprotein von HIV mit seinem Zellrezeptor, dem CD-4-Molekül. Diese Interaktion führt zu Konformationsänderungen im Hüllprotein, die zur Rekrutierung eines Korezeptors führen. In der Regel handelt es sich dabei um einen der beiden Chemokinrezeptoren CXCR4 oder CCR5³. Im Anschluss ermöglicht der gebildete Molekülkomplex die Fusion der Virushülle vermutlich mit der Plasmamembran ((Gallo, Finnegan et al. 2003)) eventuell auch mit einer Endosommembran ((Miyauchi, Kim et al. 2009), siehe Abschnitt 1.8). Die direkt nach der Fusion stattfindenden Prozesse sind noch nicht vollständig verstanden. Vermutlich wird die Matrix-Hülle vom Virusgenom getrennt (siehe auch 1.5, (Lampe, Briggs et al. 2007)). Die Kapsidhülle untergeht kontrollierte Konformationsänderungen, um spätere Schritte im Replikationszyklus zu ermöglichen (*uncoating*, (Fitton, Leschonsky et al. 2000), (Forshey, von Schwedler et al. 2002)). Durch Konformationsänderungen im Zytosol nach der Fusion wird die Reverse Transkriptase aktiviert, welche mit den zwei einzelsträngigen RNS-Kopien als Vorlage das RNS-Genom in ein doppelsträngiges DNS-Genom transkribiert. Bei diesem Vorgang werden einmalige Sequenzen, die an jedem Ende der viralen RNS liegen, verdoppelt und an die Enden des neuen DNS-Genoms angehängt. Diese werden lange terminale Wiederholungen (*long terminal repeats*, LTR) genannt. Mit der doppelsträngigen DNS formt sich der Präintegrationskomplex (*preintegration complex*, PIC), der in den Zellkern gelangt und dort die Integration der Virus-DNS in die Wirts-DNS katalysiert.

³ Die Chemokinrezeptoren CXCR4 (α -Chemokinrezeptor) und CCR5 (β -Chemokinrezeptor) sind integrale Membranproteine mit sieben transmembrandurchspannenden Helices. Sie sind mit für die Chemotaxis z.B. von Immunzellen verantwortlich. CXCR4 wird vor allem auf naiven T-Zellen und CD34+-B-Zellen exprimiert. Sein Ligand ist das Chemokin SDF-1. CCR5 findet sich unter anderem auf Monozyten, dendritischen Zellen und T-Zellen. Sein Ligand ist das Chemokin RANTES. Verschiedene Virusstämme unterscheiden sich in ihrem Vermögen, den einen oder anderen Korezeptor zu verwenden. Sie werden daher in R5-trope (vermutlich ausschließliche Nutzung von Korezeptor CCR5), R4-trope (vermutlich ausschließliche Nutzung von Korezeptor CXCR4) sowie Dual-trope Viren (Nutzung beider Korezeptoren) unterteilt.

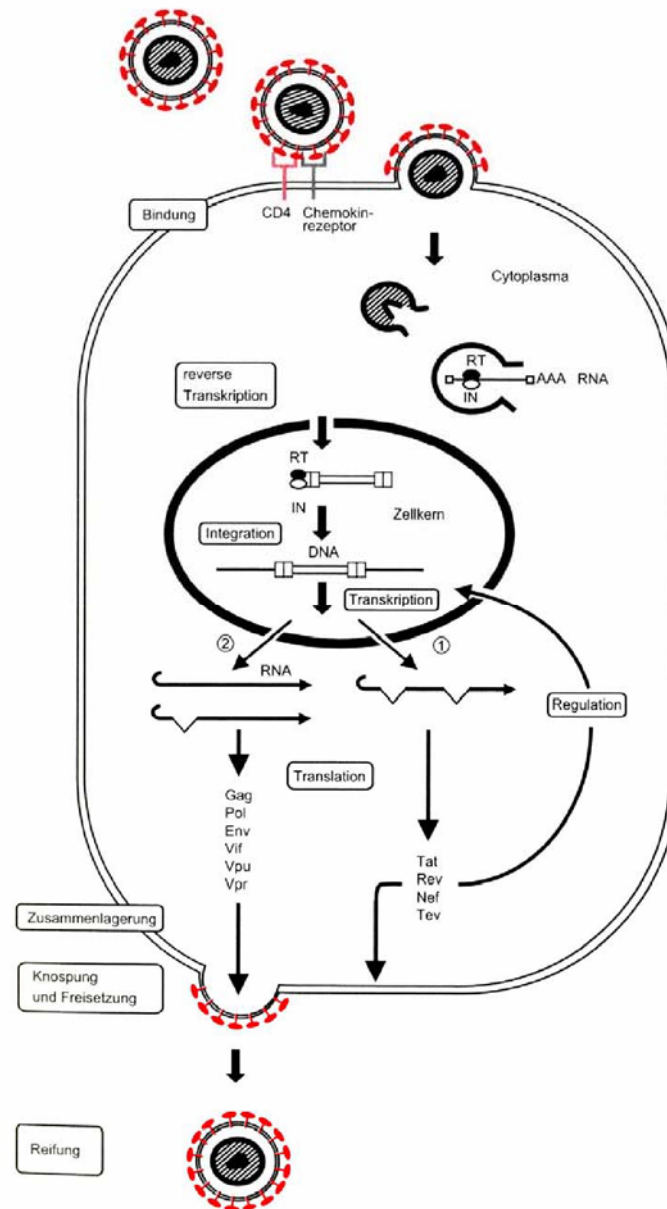


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des Replikationszykluses von HIV-1. Virus-Partikel binden über ihr Hüllprotein an der Zelloberfläche ihren Rezeptor CD4 und einen Chemokinrezeptor (i.d.R. CCR5 oder CXCR4) als Korezeptor. Nach Fusion findet im Cytoplasma das Entpacken des viralen Genoms statt (*uncoating*), um die folgende reverse Transkription des RNS- in ein DNS-Genom zu ermöglichen. Nach Import in den Nukleus integriert das Virusgenom in die Wirts-DNS. Während der Frühphase der viralen Transkription wird die entstandene mRNS gespliced, so dass vorrangig akzessorische Proteine des Virus gebildet werden. In der späten Phase werden vornehmlich Strukturproteine gebildet, die sich an der Plasmamembran mit viralem RNS-Genom zusammenfinden und neue Partikel bilden (nach (Modrow, Falke et al. 2003)).

Die genaue Zusammensetzung des PIC ist derzeit nicht bekannt, es werden allerdings neben der DNS und Integrase (IN) auch die Proteine Vpr, Nukleokapsid (*nucleocapsid*, NC) und wenige Kopien des MA-Proteins diskutiert ((Bukrinsky 2004), (Fassati and Goff 2001), (Li, Olvera et al. 2001)) (siehe auch Abschnitt 1.5).

Das als Provirus bezeichnete integrierte Teil des Virus-Genoms kann im Latenzzustand über Jahre hinweg persistieren. Die viralen Proteine werden von insgesamt mehr als 30 mRNA-Spezien synthetisiert, die durch Splicen aus wenigen primären Transkripten gebildet werden ((Fisher, Feinberg et al. 1986)). Die Regulation des Splicens sorgt für das Umschalten zwischen einer frühen und einer späten Expressionsphase. Dazu bindet das mit der Zeit im Zellkern akkumulierende Rev an das auf Rev-reagierende-Element der mRNS (*Rev-responsive-element*, RRE) und ermöglicht so den Export von teilweise oder vollkommen ungesplicerter viraler mRNS. Die frühen Genprodukte, die akzessorischen Proteine Tat, Rev und Nef, werden von der vollständig gesplicten mRNS im Zytosol translatiert, wogegen die später im Replikationszyklus exprimierten Strukturproteine und enzymatischen Komponenten von einfach- oder ungesplicten Transkripten ebenfalls im Zytosol translatiert werden. Nur das Env-Polypeptid wird am rauen Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und gelangt über den Transport durch den Golgi Apparat in die Plasmamembran der Zelle.

Das Produkt des *gag*-Gens ist das pr55Gag-Polypeptid. Durch einen Sprung im Leseraster während der Transkription entsteht die 160Gag-Pol-Vorstufe. Das Gag-Protein besitzt drei Strukturen, die es zur Plasmamembran dirigieren. Sie werden als M (Membranbindung), I (Interaktion) und L (*late*) bezeichnet. Die Membranbindung (M) ist in der MA-Domäne lokalisiert, welche durch Konformationsänderungen während der Gag-Polymerisierung (vermittelt durch I, in der CA-Domäne) noch verstärkt wird. Die neu synthetisierten Proteine und in der Regel zwei Kopien des Virusgenoms werden dann zur Plasmamembran gebracht und formen dort neue Partikel. Die Synthese neuer Partikel findet vermutlich bevorzugt an so genannten Lipid-Mikrodomänen statt ((Nguyen and Hildreth 2000), (Ono and Freed 2005)), was z.B. zu einer hohen Menge an Cholesterol und Sphingosin in der Membran des Virus führt. Das Abschnüren der neuen Partikel von der Plasmamembran wird von dem zellulären ESCRT-Komplex (*endosomal sorting complex required for transport*) katalysiert, der durch die L-Funktion des Gag an den Ort der Assemblierung gebracht wird ((Adamson and Freed 2007)).

Während oder kurz nach der Abschnürung spaltet die virale Protease (PR) unter anderem das Gag-Polypeptid in seine Untereinheiten (aufgelistet von N- zu C-Terminus): MA, Kapsid (CA), Spacerprotein 1 (SP1), NC, Spacerprotein 2 (SP2) und dem C-Terminus p6 ((Freed 1998)). Ebenfalls durch die virale Protease wird sie in die viralen Enzyme (PR, p10), die Reverse Transkriptase (RT, p66/p51) und die Integrase (IN, p32) gespalten. Dieser Prozess der Partikelreifung (*maturation*) wandelt das vorher nicht infektiöse Partikel in ein infektiöses um. Im Gegensatz dazu wird die *env*-kodierte gp160-Env-Vorstufe bereits durch die zelluläre Protease Furin in die Oberflächenproteine gp120 und gp41 gespalten.

1.5 Das Matrix-Protein

Die MA-Domäne (17kDa) im Gag-Polypeptid ist für die Membranbindung während des Knospungsprozesses von HIV verantwortlich. Dabei vermitteln sowohl eine Ansammlung von basischen Aminosäuren als auch ein Myristylanker die Membranbindung ((Zhou, Parent et al. 1994), (Dong, Li et al. 2005)). Der Myristylanker kann in zwei Konformationen vorliegen. Befindet sich das monomere Molekül ungebunden in Lösung, bindet er direkt an die Matrixdomäne. Durch die Polymerisation von Gag zu mindestens Trimeren wird diese Bindung des Myristylankers verhindert. Der Myristylanker extendiert (die zweite mögliche Konformation) und kann so mit anderen Komponenten wie Membranen interagieren. Er inseriert in die Membran und vermittelt die Bindung an die Membran (Abb. 1.4). In dieser Form weist die MA-Domäne eine besondere Affinität zu Phosphoinositol-(3,4,)-Bisphosphat (PIP₂) auf ((Tang, Loeliger et al. 2004)). Die PIP₂-Bindung sorgt dafür, dass die Synthese neuer Viren an der Plasmamembran stattfindet ((Adamson and Freed 2007)). Das vornehmlich in lipidungeordneten Domänen der Plasmamembran befindliche PIP₂ erhält durch die Bindung eines Matrixproteins einen zusätzlichen Lipidanker ((Saad, Miller et al. 2006)). Außerdem wird die 2'-Acylkette des PIP₂ an die MA gebunden. Es wird diskutiert, dass dies zu einer Umverteilung von PIP₂ zu geordneten Lipiddomänen und damit der Matix führt. Dieses ist vermutlich für den Cholesterol- und Sphingosinreichtum der viralen Lipidhülle verantwortlich ((Brügger, Glass et al. 2005), (Saad, Miller et al. 2006)).

Nach oder während der Freisetzung des Virus findet die Partikelreifung statt, bei der das Gag von der viralen Protease in seine Domänen gespalten wird. Die MA verbleibt im reifen Partikel an der Membran.

Während des Eintrittsprozesses geht das MA-Protein vermutlich vom Partikel verloren. Mittels VSV-G pseudotypisierten Viren wurde gezeigt, dass das MA-Protein prinzipiell zu späten Zeitpunkten nach der Fusion im Zytosol verbleibt. Mittels Westernblotanalyse aufgereinigter PIC wurde allerdings bestätigt, dass ein gewisser Anteil der MA noch mit dem Genom assoziiert ist ((Miller, Farnet et al. 1997), (Fassati and Goff 2001), (Bukrinsky 2004)). Ob die MA mit dem PIC in den Kern transloziert, wurde in der Vergangenheit diskutiert. Zum einen wurde aus der Aminosäuresequenz ein Kernimportsignal postuliert ((Bukrinsky, Haggerty et al. 1993)), zum anderen dominiert in zellulär exprimierter MA der Kernexport ((Dupont, Sharova et al. 1999), (Lampe, Briggs et al. 2007)). Außerdem kann die MA-Domäne durch eine andere Membranbindungsdomäne ersetzt werden. So entstandene Viren haben kein Infektionsdefizit. Daher besitzt MA zumindest keine essentielle Rolle während des Infektionsprozesses.

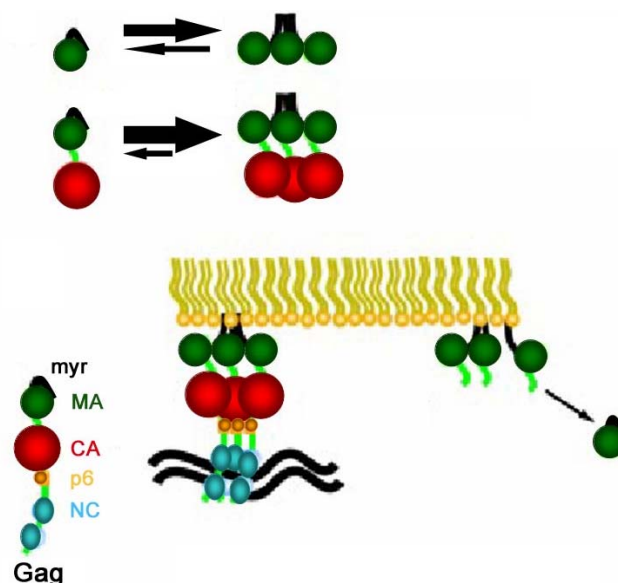


Abb. 1.4 Schematische Darstellung des Myristyl-Switches (nach (Tang, Loeliger et al. 2004)): In monomeren Gag oder MA (grün) bindet der Myristylanker hauptsächlich an die MA-Domäne zurück (oben). In Gag-(MA-)Multimeren extendiert der Myristylanker. Nach Spaltung von CA (rot) von dem MA-Protein liegt das Gleichgewicht weniger deutlich auf der Seite von polymeren Molekülen mit extendiertem Myristylanker. Dieser Mechanismus unterstützt die Assemblierung von Gag an der Plasmamembran (unten, links). Nach Proteolyse ist auch das MA-Protein nicht mehr so stark an die Membran gebunden und kann sich unter Umständen ablösen (unten, rechts).

1.6 Das Virale Protein R

Das Virale Protein R (Vpr) ist ein akzessorisches Protein von HIV, welches zu den späteren Produkten der HIV-Proteinsynthese gehört. Es besteht aus 96 Aminosäuren (apparentes Molekulargewicht 14 kDa) und ist in den eng verwandten Virustypen HIV-1, -2 und Simian Immunodefizienz Virus (SIV) stark konserviert. Über direkte Interaktion mit der C-terminalen p6-Domäne von Gag wird es in das sich formende Virus verpackt. Nach der Prozessierung von Gag durch die Protease bindet es bevorzugt an das NC ((Rocquigny, Petitjean et al. 1997), (Jenkins, Sanchez et al. 2001), (Selig, Pages et al. 1999)). Im reifen Partikel findet es sich hauptsächlich im Viruskern. Zumindest teilweise verbleibt das Vpr auch im Präintegrationskomplex ((Bukrinsky 2004), (Fassati and Goff 2001), (Li, Olvera et al. 2001)). Es besitzt zwar keine Nukleusimportsequenz, kann allerdings in den Kern inkorporiert werden. Bei alleiniger Expression lokalisiert es hauptsächlich an den Kernporen. Dies könnte ein Hinweis sein, dass es mit dem Präintegrationskomplex in den Nukleus transportiert wird bzw. den Transport durch die Kernporen mit ermöglicht ((Fouchier and al. 1998), (Rouzic and al 2002)).

Zu den bekannten Funktionen des Vpr gehören:

- Es verstärkt den Import viraler DNS in den Nukleus ((Connor, Chen et al. 1995), (Conner and Schmid 2003))
- Es hält T-Zellen in der G2-Phase der Mitose an ((de Noronha, Sherman et al. 2001),).
- Es führt zu einer Erhöhung der transkriptionellen Aktivität der LTR und induziert Apoptose ((Gummuluru and Emerman 1999), (Hrimech, Yao et al. 1999), (Alimonti, Ball et al. 2003)).

Außerdem wird ihm eine Rolle bei dem Verlust der T-Zellen zugesprochen. Es sollen sich etwa 350 bis 700 Moleküle Vpr in einem Virus befinden. Auch N-terminale Fusionsproteine von Vpr werden in das Virus inkorporiert. Dieser Umstand wurde in der Vergangenheit ausgenutzt, um neben fluoreszenzmarkierten Vpr auch andere Proteine wie die IN oder das Enzym der β -Lactamase in das Virus zu inkorporieren.

1.7 Das Integrase-Protein

Die Integrase ist eines der charakteristischen Enzyme der Retroviren. Es vermittelt mit der Integration des viralen Genoms in die Wirts-DNS eine Schlüsselreaktion des retroviralen Replikationszyklusses ((Whitcomb and Hughes 2003), (Goff 2003)). Es wird als Bestandteil des Gag-Pol-Polyproteins in naszierende Partikel integriert. Im reifen Partikel befindet es sich im Viruskern. Es verbleibt während des Eindringens des Virus in die Zelle bei der RNS und gelangt nach der reversen Transkription als Bestandteil des Präintegrationskomplexes in den Kern der Wirtszelle, ((Miller, Farnet et al. 1997), (Fassati and Goff 2001), (Bukrinsky 2004)).

Die Integrase (32-kDa) ist aus drei strukturell und funktionell unterschiedlichen Domänen aufgebaut, dem N-Terminus, dem katalytischen Zentrum und dem C-Terminus. Der N-Terminus, der mittels eines HHCC-Motifs Zinkionen bindet, ist für die Multimerisierung des Proteins, vermutlich in Tetramere, verantwortlich. Das katalytische Zentrum enthält ein konserviertes D,D-35-E Motif, welches sehr wichtig für die katalytische Aktivität des Proteins ist ((Chow, Vincent et al. 1992), (Bushman, Engelman et al. 1993)). Der C-Terminus bindet die DNS unspezifisch ((Greenwald, Le et al. 1999)). Funktionell stellt es vermutlich ein Tetramer dar ((Cherepanov, Maertens et al. 2008)). Zur Integration schneidet die Integrase zwei Nukleotide vom 3'-Ende der viralen DNS (genannt 3'-Prozessierung) und integriert anschließend das veränderte 3'-Ende in die Wirts-DNS. Im so entstandenen Integrationszwischenprodukt verbleiben das 3'-Ende des Wirts und das 5'-Ende des Virus unverbunden. Zur Vollendung der Integration werden die ungepaarten Nukleotide am 5'-Ende des Virus entfernt und vermutlich durch Reparaturenzyme des Wirts aufgefüllt ((Chow, Vincent et al. 1992)).

1.8 Viruseintritt

Hauptfunktion viraler Partikel ist das Überbringen ihrer genetischen Information in eine Wirtszelle. Dabei stellt eine zelluläre Membran das erste Hindernis dar, das Viren überwinden müssen.

Dazu muss das Virus zuerst an einen oder mehrere Zellrezeptoren binden. Man unterscheidet spezifische und unspezifische Zellrezeptoren. Die Verteilung der spezifischen Rezeptoren bestimmt, welche Arten von Zellen infizierbar sind. Erste unspezifische Wechselwirkungen werden oft von Glykosaminoglykane wie

Heparansulfat oder Glykolipiden vermittelt ((Ugolini, Mondor et al. 1999), (Young, Knipe et al. 2001), (Vlasak, Goesler et al. 2005)). Anschließend interagieren virale Oberflächenproteine mit spezifischen Rezeptoren, zu denen Iontentransporter, Adhäsionsfaktoren, Signalproteine und andere Oberflächenproteine gehören ((Kwong, Wyatt et al. 1998), (Rossmann, He et al. 2002), (Skehel and Wiley 2002), (Stewart, Dermody et al. 2003)). Trotz einer hohen Spezifität der Bindung sind viele Virus-Rezeptorinteraktionen von geringer Affinität, weshalb oft mehrere zelluläre Rezeptoren benutzt werden, was nicht nur zu einer Steigerung der Bindung führt, sondern die entstandenen Molekülcluster auch als Ausgangspunkt für Signalkaskaden dienen könnten. Der Rezeptor bleibt bei den spezifischen Virus-Zell-Wechselwirkungen auch während einer eventuellen Endozytose gebunden. In manchen Fällen ist er auch an der folgenden Fusionsreaktion beteiligt.

Für die Fusion durchbrechen Viren entweder die Plasmamembran oder innere Vesikelmembranen der Zelle, in die sie durch Endozytose gelangen. Die meisten Retroviren und Herpes Simplex Virus 1 haben einen pH-Wert unabhängigen Fusionsschritt, weshalb vermutet wurde, dass sie ihre Fusionsreaktion an der Plasmamembran stattfindet ((Maddon, McDougal et al. 1988), (Pelchen-Matthews, Clapham et al. 1995)). Ein alternativer Virus-Eintrittsweg verläuft über Endozytose. Jedoch erfolgt dabei die Membranfusion bereits vor Azidifizierung des Endosoms. Die beiden Eintrittswege unabhängig von einander zu untersuchen ist schwierig, da Endozytose von Viruspartikeln immer parallel stattfindet. Es ist deshalb oft unklar, ob endozytierte Viruspartikel zur Infektion führen können oder nur lysosomal abgebaut werden. Für Herpes Simplex ist Fusion an der Plasmamembran und im Endosom durch Studien belegt und beide Wege führen zur Infektion. Im Falle von HIV wurde die Fusion an der Plasmamembran als alleiniger Weg zur Infektion einer Zelle zuletzt angezweifelt. So konnte beispielsweise für HIV gezeigt werden, dass endozytierte Partikel zur Infektion beitragen können ((Fackler and Peterlin 2000), (Daecke, Fackler et al. 2005)). Mittlerweile gibt es Hinweise, dass im Fall von HIV die Endozytose der Haupteintrittsweg für die Infektion sein könnte ((Miyachi, Kim et al. 2009)). Endozytose hat gegenüber der Fusion an der Plasmamembran für die Viren einige Vorteile. So werden der Aktinkortex der Zelle und ein Großteil des sehr viskosen Zytosols mit Hilfe zelleigener Mechanismen durchdrungen ((Marsh and Bron 1997); (Dohner and Sodeik 2005)). Der zuerst entdeckte Endozytoseweg stellt

die Clathrin-abhängige Endozytose dar. Mittlerweile sind verschiedene Alternativen gefunden worden. So werden Einbuchtungen in der Zelloberfläche, sogenannte Caveolae, für die Endozytose genutzt ((Parton and Simons 2007)). Ein anderer Startpunkt sind Lipiddomänen, von welchen es verschiedene Varianten gibt ((Marsh and Helenius 2006)).

Offensichtlich benutzen Viren (wie z.B. Adenoviren (Li, Stupack et al. 1998); (Nemerow and Stewart 1999)) häufig Signalproteine für ihre Fusion. Neben den vielen Beispielen für Signalrezeptoren gibt es zunehmend Hinweise darauf, dass Viren zusätzlich Lipidplattformen für ihre Interaktion nutzen, um Signalwege in die Zelle effizient zu aktivieren. ((Damm 2005), (Ono and Freed 2005), (Coyne and Bergelson 2006)). Eine Aktivierung könnte unter Umständen dazu dienen, den unter der Plasmamembran der Zelle gelegenen Aktinkortex lokal zu depolymerisieren und so den Weg des Virus weiter ins Zellinnere zu erleichtern.

Neben dem Aktinkortex stellt der Transport durch das Zytosol eine Limitierung für einen Virus dar. Für ein relativ großes Objekt wie ein Komplex aus Virusproteinen und -Genom ist dort ein Transport durch Diffusion allein quasi unmöglich. Daher bedienen sich viele Viren des Zytoskeletts, um ihren intrazellulären Replikationsort zu erreichen. So werden Herpeskapside und auch HIV-Proteine mittels Motorproteinen entlang von Mikrotubuli bewegt.

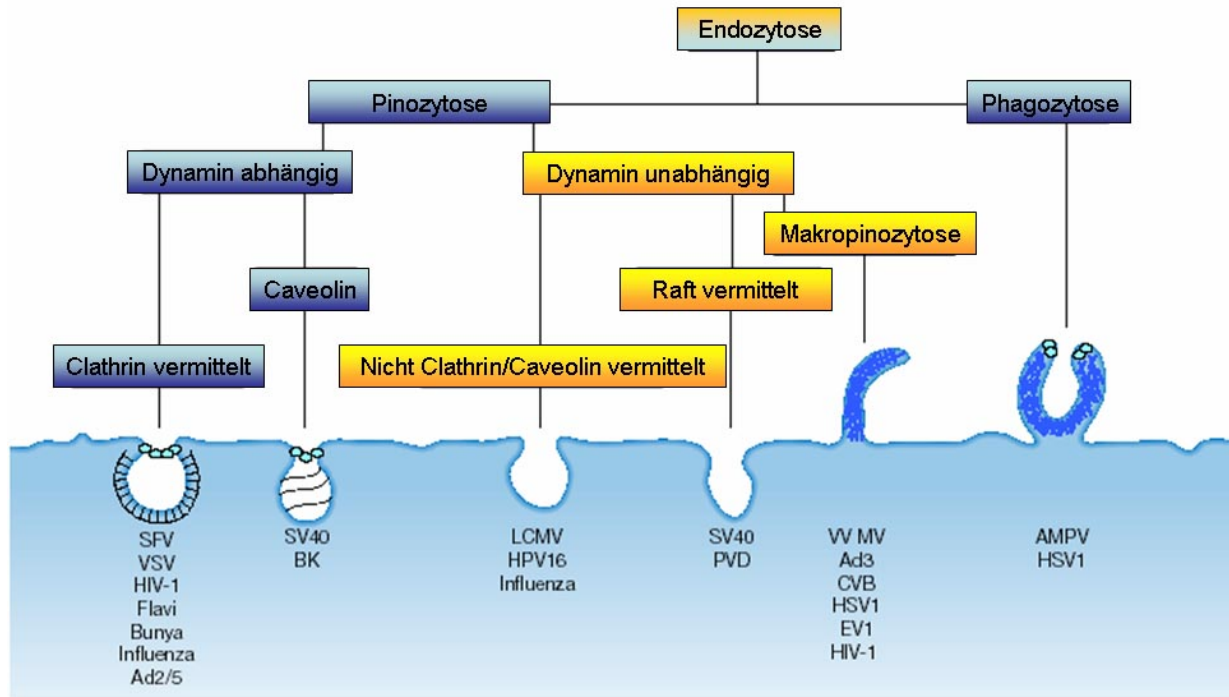


Abb. 1.5: Verschiedene Arten der Endozytose mit Beispielen von Viren, die diese nutzen (adaptiert aus (Marsh and Helenius 2006)). Die unterschiedlichen Endozytosewege können nach ihrer Dynaminabhängigkeit eingeteilt werden (dynaminunabhängig, gelb; dynaminabhängig, blau). Dynamin- und clathrinunabhängig können z.B. Influenzaviren und Papillomaviren aufgenommen werden. Sehr häufig werden Viruspartikel über dynamin- und clathrinabhängige Endozytose aufgenommen.

1.9 Die HIV-Fusion

Die Virusfusionsproteine von Retroviren gehören zur Klasse 1⁴. Im Fall von HIV-1 wird die Fusion von gp120 (bildet die Oberflächeneinheit, SU) und gp41 (bildet die Transmembraneinheit, TM) vermittelt ((McCune, Rabin et al. 1988)), die aus dem Env-Polyprotein hervor gehen. Das gp41 besitzt die zwei Helices HR1 und HR2 sowie das eigentliche Fusionspeptid. Die beiden Glykoproteine liegen zusammen als trimere Einheit in der Virusmembran vor, jedoch nicht kovalent aneinander gebunden ((Lu, Blacklow et al. 1995)).

⁴ Derzeit werden drei unterschiedliche Klassen von viralen Fusionsproteinen unterschieden. Die Unterscheidung erfolgt über die Struktur der „extrazellulären“ Domäne (Melikyan, G. B. (2008). "Common principles and intermediates of viral protein-mediated fusion: the HIV-1 paradigm." *Retrovirology* 5(1): 111-124.). Klasse 1 beinhaltet Fusionsproteine mit vornehmlich α -helicale Motive, Klasse 2 vorwiegend β -Faltblatt Motive und Klasse 3 Motive mit Anteilen von beiden. Weitere Beispiele von Viren mit Fusionsproteinen anderer Klassen: Klasse 2: Dengue Virus; Klasse 3: VSV (Harrison, S. C. (2008). "Viral membrane fusion." *Nat Struct Mol Biol* 15(7): 690-698.).

Initial bindet das Oberflächenprotein gp120 an den zellulären Rezeptor CD4. Dies verursacht eine Konformationsänderung im gp120, welche die Korezeptorbindungsstelle exponiert. Je nach dem Tropismus des Virus der hauptsächlich von der V3-Schleife des gp120 bestimmt wird, handelt es sich dabei um den CCR5- oder CXCR4-Korezeptor. Nach Bindung von Rezeptor und Korezeptor erfolgt eine Konformationsänderung in gp41, wodurch die zwei Helices HR1 und HR2 miteinander die Fusion antreibende 6-Helix-Bündel bilden können (Abb. 1.6). Dieser Prozess bringt die beiden Membranen dicht aneinander. Bei der Verbindung der Membranen, der eigentlichen Fusion, werden verschiedene Zwischenprodukte diskutiert, die relativ stabile Übergangsprodukte sein können. Im ersten Zwischenprodukt einer Fusion sind die äußeren Schichten der jeweiligen Membranen schon miteinander fusioniert, während die inneren noch getrennt sind ((Ellens, Bentz et al. 1985), (Leventis, Gagné et al. 1986), (Kemble, Danieli et al. 1994)). Dieser Zustand stellt eine Hemifusion dar.

Ein weiterer die Kinetik minimierender Schritt stellt das Öffnen der Fusionspore dar ((Markosyan, Cohen et al. 2003)). Dies wurde unter anderem anhand der viralen Fusion von HIV-1 gezeigt ((Melikyan, Markosyan et al. 2000), (Melikyan, Barnard et al. 2005)). Nach Formierung des 6-Helix-Bündels ist die Bildung der Fusionspore abgeschlossen, und der Viruskern wird ins Zytosol entlassen.

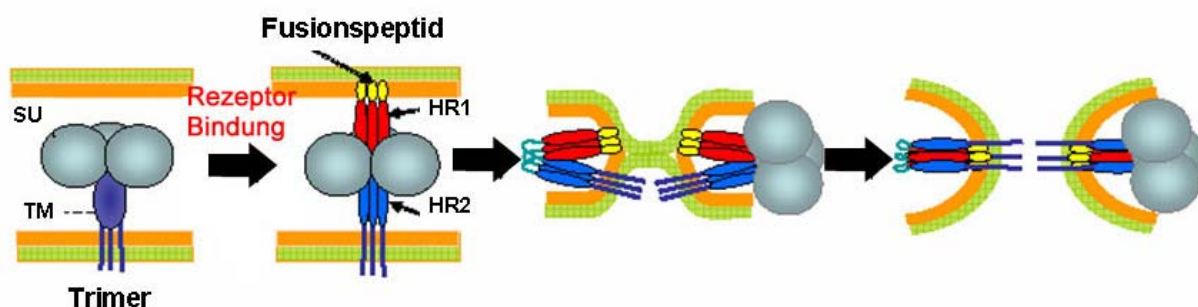


Abb. 1.6: Darstellung der Fusion. Viruseigenes trimeres Hüllprotein bindet an CD4 der Wirtszelle. Im Fall von HIV-1 wird im Anschluss der Korezeptor rekrutiert (nicht dargestellt). Rezeptorbindung oder niedriger pH führen zu Konformationsänderungen in der Transmembrandomäne (TM). Diese ermöglicht die Insertion von HR1 in der Zellmembran (zweites Bild). Durch die Zusammenlagerung von HR1 und HR2 zum 6-Helixbündel werden die Membranen aneinander gebracht und die Energie für die Fusion gebildet. Über die Hemifusion der beiden Membranen (drittes Bild) kommt es schließlich zur völligen Verschmelzung beider Membranen und der Fusionsporenöffnung (viertes Bild, nach (Melikyan 2008)).

1.10 Uncoating

Nach der Fusion ist das Virus darauf angewiesen, die reverse Transkription durchzuführen. Es ist daher unerlässlich, dem RNS-Genom und der Reversen Transkriptase, durch den teilweisen Abbau der Kapsidhülle, Zugang zu den zellulären Nukleotiden und anderen benötigten zellulären Komponenten zu geben ((Dvorin and Malim 2003)). Interessanterweise verursachen Mutationen im viralen Kapsid, egal ob sie stabilisierend oder destabilisierend auf das virale Kapsid wirken, eine Inhibierung der Infektion ((Stremlau, Owens et al. 2004), (Arhel, Souquere-Besse et al. 2007)). Dies liegt vermutlich an verschiedenen zellulären Proteinen der Trim-Familie (z.B: Trim5 α ((Stremlau, Owens et al. 2004))), die mit dem Viruskapsid der Mutanten interagieren können und eine Infektion dadurch verhindern. Nach der reversen Transkription wird der PIC gebildet. Dieser besteht aus den viralen Proteinen IN, RT, Vpr und vermutlich einem Rest von MA. Zusätzlich interagieren mit diesem die zellulären Proteine Cyclophilin A ((Thali, Bukovsky et al. 1994), (Franke, Yuan et al. 1994)) und LEDGF ((Cherepanov and al. 2003)).

1.11 Darstellung der Fusion von Retroviren auf Einzelpartikelebene.

Verschiedene Studien haben sich in der letzten Zeit mit der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Virusfusion auf Einzelpartikelebene beschäftigt. Dazu stehen verschiedene Methoden zur Fluoreszenzmarkierung von Viruspartikeln zur Verfügung. Durch Zugabe von an reaktive Gruppen gekoppelte Fluorophore zu aufgereinigten Viruspartikeln können die äußeren Strukturen des Virus zufällig markiert werden (im Falle von nicht umhüllten Viren also das Viruskapsid, bei umhüllten Viren die Hüllproteine und die Lipide der Virusmembranen). Für umhüllte Viren können anstelle der reaktiven Gruppen lipidähnliche fluoreszierende Spezies verwendet werden. Diese inserieren in die Virusmembran.

Eine andere Strategie stellt die Kopplung z.B. viraler Strukturproteine an autofluoreszierende Proteine dar. Durch den Einbau der fluoreszierenden Strukturproteine wird so das Viruspartikel markiert. Anstelle der Verwendung von autofluoreszierenden Proteinen können auch Tag-Systeme verwendet werden. An diese können später organische Fluorophore mit optimalen

Fluoreszenzeigenschaften gekoppelt werden. Mit diesen Methoden können Viren markiert und während der Virus-Zell-Interaktion verfolgt werden.

Eine Aussage über den Eintritt der Viren in die Zelle lässt sich nur indirekt Auskunft gewinnen. Dazu sind spezielle Virusmarkierungsstrategien nötig. Für die Darstellung von Fusionsereignissen einzelner Partikel wurden mehrfach markierte Partikel verwendet ((Markosyan, Cohen et al. 2000), (Rust, Lakadamyali et al. 2004), (Melikyan, Barnard et al. 2005)). Änderungen in den Fluoreszenzsignalen sollen bei der Fusion spezifisch den Eintritt des Partikels in die Zelle anzeigen. Bei mehrfach markierten Partikeln kann sich ein Fluoreszenzsignal z.B. auflösen, sich von den anderen separieren oder durch Dequenchen ihre Intensität stark verändern.

Für umhüllte Viren wie Influenza und HIV wurde der lipophile Farbstoff DiD (1,1'-**Di**octadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanin) verwendet. Dieser Farbstoff integriert in die äußere Schicht von Lipidmembranen. Im Fall von Influenza-Viren ist die Membran mit DiD so stark bepackt, dass sich die π -Elektronensysteme der Fluorophormoleküle gegenseitig beeinflussen. Anstatt den angeregten Zustand nach Absorption eines Photons durch Emission eines Photons zu verlassen, erfolgt eine strahlungslose Deaktivierung des angeregten Zustands (Quenchen). Zu einem Dequenchen kommt es, wenn sich bei einer Fusion mit einer anderen Membran die Fluoreszenzmoleküle in der Ziellmembran verdünnen. Die Fluorophore gewinnen also im Moment der Fusion an Intensität. So konnte eine Clathrin-abhängige Endozytose, gefolgt von Fusion gezeigt werden ((Rust, Lakadamyali et al. 2004)).

Mit DiD markierte HI-Viren dagegen zeigen einen Verlust des DiDs im Moment der Fusion bzw. Hemifusion ((Melikyan, Barnard et al. 2005)). Diese Partikel sind schwächer mit DiD beladen, so dass ein Dequenchen in der Regel nicht beobachtet wird. Werden diese Viren also erst endozytiert, und fusionieren mit einem kleinen Endosom, verbleibt die DiD-Markierung im Endosom als punktierte Struktur sichtbar ((Miyachi, Kim et al. 2009)). Die DiD-Markierung geht schon im Moment der Hemifusion verloren, da DiD sich vornehmlich in der äußeren Membran befindet. Zur Unterscheidung von Hemifusion und Fusion wird daher ein nicht an virale Strukturen gebundener Fluoreszenzfarbstoff in das Virus eingeführt, welcher bei der Fusionsporenbildung vom Partikel verloren gehen soll. Auf diese Weise wurde demonstriert, dass viele HI-Viren an der Plasmamembran hauptsächlich Hemifusion durchführen (ihr DiD-Signal verlieren), aus der sie meist nicht in der Lage sind die Fusion abzuschließen (die Fusionspore zu öffnen und den inneren Marker zu

verlieren). Andererseits sind Fusionsereignisse aus Endosomen beobachtet worden. Die Markierung von HIV mit DiD kann nicht zwischen Fusion und Hemifusion unterscheiden. Der Anteil der HI-Viren, die sich durch DiD markieren lassen, beträgt etwa 20% ((Melikyan, Barnard et al. 2005)).

Im Falle von HIV wurden verschiedene Fusionsproteine zur Darstellung von Viren im Fluoreszenzmikroskop eingeführt. So existieren N-terminal markierte Vpr-Konstrukte, welche unter anderem zur Beobachtung von VSV-G pseudotypisierten HIV-Partikeln und dem Transport von HIV-Cores im Zytosol verwendet wurden ((McDonald, Vodicka et al. 2002)). Mittels einer auf Tetracysteine beruhende Markierung wurden CA und damit HIV-Kerne markiert ((Campbell, Perez et al. 2008)). Auch von MA existieren fluoreszierende C-terminale Konstrukte, die zur Darstellung einzelner Viren verwendet wurden ((Muller, Daecke et al. 2004), (Lampe, Briggs et al. 2007)). Bei hoher Expression von markierten Konstrukten wird die Infektiosität der Partikel stark beeinträchtigt ((Muller, Daecke et al. 2004)). Dies kann umgangen werden, indem eine Proteasespaltungsstelle zwischen MA und Fluorophor eingeführt wird ((Miyachi, Kim et al. 2009)). Als Fusionsmarker wurden neben dem schon verwendeten DiD transmembrane Anker von Proteinen an Fluorophore gekoppelt und in virusproduzierende Zellen transfiziert. Allerdings wurde nie eine überzeugende Anzahl an Fusionsereignissen gefunden ((Campbell, Perez et al. 2007)).

Viele Markierungen für *live cell imaging* beruhen auf der Expression von fluoreszierenden Proteinen, die an ein zu untersuchendes Protein fusioniert sind. Die heutigen fluoreszierenden Proteine sind gegenüber den synthetischen Fluorophoren (kleinen organischen Verbindungen wie den Rhodaminen, ALEXA oder ATTO-Farbstoffen) in Quantenausbeute und Lebensdauer unterlegen. Es liegt nahe, bei Markierungsversuchen, bei denen nur wenige Fluorophore die Zielstruktur markieren können (wie Viren oder der Untersuchung einzelner Proteine), auf fluoreszierende Proteine zu verzichten. Außerdem sind sterische Behinderungen des markierten Proteins durch die kleinen organischen Fluorophore weniger wahrscheinlich als z.B. bei GFP. Andere Möglichkeiten stellen so genannte Tag-Systeme dar, wie z.B. der Tetracystein-Tag oder der SNAP-Tag. Bei letzterem wird eine Zwischenstufe in der normalerweise von der O⁶-Alkylguanine-DNS Alkyltransferase katalysierten Reaktion ausgenutzt. Eine optimierte Variante dieses Proteins wird an Stelle von z.B. GFP mit dem Zielprotein fusioniert und exprimiert. Für die Markierung wird ein für das Protein

nicht spaltbares Substrat, an das ein organischer Fluorophor gekoppelt ist, eingesetzt. Das Protein reagiert mit dem Substrat wie das Wildtypenzym bis zu einem Punkt, an dem das Protein und Substrat (und damit auch der Fluorophor) kovalent verbunden sind ((Keppler, Kindermann et al. 2004)). Dies führt zu einer quantitativen Markierung des Zielproteins durch kovalent gebundene, organische Fluorophore und einer kleineren zusätzlichen Domäne als die Markierung mit fluoreszierenden Proteinen.

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde versucht, die Fusion durch den Verlust des mit Membranen assoziierten MA-Proteins vom viralen Kern (mit fluoreszenzmarkiertem Vpr) zu zeigen. Zur Steigerung der Fusogenität wurden VSV-G pseudotypisierte Viren verwendet. Zur Automatisierung der Analyse wurde ein Algorithmus zum Virustracking erstellt (siehe (Godinez, Lampe et al. 2009)). Es konnte gezeigt werden, dass in dem verwendeten System die erwartete Farbtrennung innerhalb der ersten 3 Stunden der Virus-Zell-Inkubation auftrat ((Lampe, Briggs et al. 2007)). Trotz intensiver Suche wurde allerdings nur ein Farbtrennungs- und damit Fusionsereignis gefunden ((Lampe 2007)).

1.12 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung früher Ereignisse der Infektion von Retroviren durch Visualisierung der Fusion der Retroviren auf Einzelpartikelebene.

Als erster Schritt wurden doppelt markierte Viren erzeugt, die bei der Fusion eine in der Virusmembran lokalisierte Fluoreszenzmarkierung verlieren. Dazu war eine Fluoreszenzmarkierung in der viralen Membranhülle zu etablieren. Getestet wurden fluoreszierende Lipide, an Membrananker fusionierte fluoreszierende Proteine und eine fluoreszenzmarkierte und weiterhin fusogene Variante des MLV Hüllproteins. Nach dem Vergleich der verschiedenen Markierungsstrategien hinsichtlich der Markierungseffizienz und ihren Auswirkungen auf die virale Eintrittskompetenz wurde das vielversprechende Markierungsverfahren über das MLV-Hüllprotein für die weiteren Untersuchungen verwendet. Mit dem MLV-Hüllprotein wurden HIV-Partikel pseudotypisiert. Die innere Partikelstruktur wurde mit fluoreszenzmarkierten Versionen der HIV-Proteine MA, IN oder Vpr visualisiert.

Für die quantitative Erfassung von Einzelpartikelfusionsereignissen wurde eine neue Versuchsanordnung etabliert und charakterisiert. Mit diesem Verfahren und den

mehrfach markierten Partikeln wurde die retrovirale Fusion auf Einzelpartikelebene untersucht. Durch Vergleich der verschiedenen inneren Marker in ihrem Verhalten nach Fusion wurde versucht, auf die folgenden Schritte, wie dem *uncoaten* des Virus und dem Transport der retroviralen Bestandteile, Rückschlüsse zu ziehen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Acrylamid-Bisacrylamid (29:1)	Rothiphoresses Gel, Roth, Karlsruhe
Agar (Bacto-Agar)	Becton-Dickinson (BD), Heidelberg
Agarose	Cambrex, Oberhachingen
Amino-N-Caprinsäure	Biomol, Hamburg
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
BG-Fluorescein	Covalys, Luzern (Schweiz)
Bovines Serumalbumin (Fraktion V)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Chroma, Fürstenfeldbruck
C-16 Körper-Bodipy	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
CCF2-AM	Invitrogen, Karlsruhe
Chloroform	Fluka, Steinheim
DHPE-Texas red	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
DiD	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
Eisessig	JT Baker, Deventer (Niederlande)
Ethanol (absolut)	Riedel de Haen, Seelze
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fibronectin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fötales Kälberserum	BioWhittaker Europe, Heidelberg
Galactosyl Ceramid-NBD	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glykogen	Beckman, Krefeld

GM1-Bodipy	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
Hefeextrakt	Becton-Dickinson, Heidelberg
HEPES	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Riedel de Haen, Seelze
Kaliumhexacyanoferrat-III	Merck, Darmstadt
Kaliumhexacyanoferrat-II	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
MES	Biomol, Hamburg
Methanol	Merck, Darmstadt
Methanol (absolut)	Merck, Darmstadt
N,N,N,N-Tetramethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem, Karlsruhe
Natronlauge (2 N)	Merck, Darmstadt
Natriumperchlorat	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
PBS (ohne Magnesium- und Kalziumchlorid)	Biochrom, Berlin
Penicillin	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphatidylethanolamine-TMR	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
Phosphatidsäure	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
Phosphatidylinositol	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
POPC	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
Propanol	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	Fluka, Steinheim
Sphingosine-NBD	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Sulfosalicylsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
TEMED	Roth, Karlsruhe
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt

Tris	Roth, Karlsruhe
Trypsininhibitor (aus der Sojabohne) (#6522)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin	Biochrom AG, Berlin
Tween-20	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck, Darmstadt
X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactosid)	Roth, Karlsruhe

2.2 Verbrauchsmaterialien, Reagenzien und Kits

CL-Xposure Film Clear Blue	Pierce, USA
Filterpapier	Whatman, Dassel
Fugene 6 Transfektions Reagenz	Roche, Mannheim
8-Kammer-Deckgläser (Lab-Tek, Nr. 155411)	Nunc, Wiesbaden
Spritzenfilter Membrex 25CA Filter (0,45 m Poren)	Membra Pure, Bodenheim
Spritzenfilter steril 0,22 m	Roth, Karlsruhe
Zellulosemischmembran 3MM	Whatman, Dassel
Nitrocellulose Transfer Membran	Whatman, Dassel
Protran BA85	
Nucleobond AX (Plasmid Preparation (Mini-, Midi- und Maxi-Kit))	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Extract II Kit	Macherey-Nagel, Düren
Polyethylinimin (PEI)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
Zellkulturmaterialien (Flaschen, Schalen, Platten)	TPP, Trasadingen (Schweiz)
Zentrifugenröhrchen (15 ml bzw. 50 ml, "Falcons")	TPP, Trasadingen (Schweiz)
Einwegpipetten, gestopft für Zellkultur (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nürnberg

2.3 Puffer und Lösungen

PBS/Tween	PBS mit Tween-20 0,05% (v/v)
ELISA-Färbelösung	0,1 M Natriumacetat 0,006 % (v/v) Wasserperoxid 1 % (w/v) Tetramethylbenzidin (TMB)
Acrylamid (30:0,8)	30 % (w/v) Acrylamid 0,15 % (w/v) Bisarylamid
Acrylamid (30:0,15%)	30 % (w/v) Acrylamid 0,8 % (w/v) Bisacrylamid
4xTrenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS
4xSammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl pH 6,8 0,4 % SDS
6 x Agarosegel- Ladepuffer	10 mM Tris-HCl pH 7,6 60 mM EDTA 60 % (w/v) Glycerin 0,15 % (w/v) Orange G 0,03 % (w/v) Xylencyanol FF
CaCl ₂ -Lösung	Wenn nicht anders angegeben: 2,5 M CaCl ₂ in H ₂ O
Färbelösung für p24 ELISA	0,1 M Natriumacetat pH 6,0 0,006 % (v/v) Wasserstoffperoxid 1 % (w/v) Tetramethylbenzidin
HBS-Lösung	50 mM Hepes 0,28 M Natriumchlorid 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ pH-Wert auf 7,05 eingestellt
Laufpuffer für SDS- Polyacrylamidgele:	Für 1 l Gebrauchslösung 1 g SDS 3,03 g Tris 14,4 g Glycin

Material und Methoden

Natriumacetat-Lösung	Wenn nicht anders angegeben: 1 M Natriumacetat in H ₂ O (pH 6,0)
PBS	0,137 M NaCl 2,7 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄
3%iges PFA	3 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS
3 x SDS Probenpuffer	125 mM Tris-HCl pH 6,8 2 % (w/v) SDS 10 % (w/v) Glycerin 0,02 % (w/v) Bromphenolblau 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol
50 x Laufpuffer für Agarosegele (TAE)	Für 1 l Lösung: 242 g Tris-HCl pH 8,0 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 7,5 1 mM EDTA
Western-Blot- Transfer-Puffer	48 mM TRIS 39 mM Glycine 0,375% SDS 20% Methanol
β-Galactosidase-Lösung	1 mg/ml X-Gal in DMSO 4 mM K ₃ Fe(CN) ₆ 4 mM K ₄ Fe(CN) ₆ 2 mM MgCl ₂ in PBS

2.4 Enzyme

Alkalische Phosphatase	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Pfu-Polymerase	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsendo- Nukleasen	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A	Macherey-Nagel, Düren
T4-DNA Ligase	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot

2.5 DNS und Protein-Standardmarker

1 kb-DNA Molekulargewichtsmarker (Invitrogen, Karlsruhe)

Proteinmarker „Mix6“ (Invitrogen, Karlsruhe)

2.6 Antiseren

Wenn nicht anders angegeben, wurden die folgenden Kaninchen-Antiseren durch Immunisierung mit aufgereinigten Proteinen oder Peptiden hergestellt. Sie wurden für Westernblotanalysen in der jeweils angegebenen Verdünnung eingesetzt. Als Zweitantikörper wurde ein kommerzieller Ziege- α -Kaninchen-Antikörper oder Ziege- α -Ratte-Antikörper (Dianova, Hamburg, *cross absorbed*), gerichtet gegen den konstanten Teil der Antikörper, verwendet, an den das Enzym Meerettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt war. Die Verdünnung des Zweitantikörpers betrug 1:10.000.

Antikörper- Bezeichnung	Verdünnung	Spezies	Herkunft
α -CA3	1:5.000	Kaninchen	AG Kräusslich
α -GFP	1:5.000	Kaninchen	Sigma-Aldrich, Steinheim
α -MA	1:5.000	Kaninchen	AG Kräusslich (Lampe, Briggs et al. 2007)
α -Vpr	1:2.000	Kaninchen	AG Kräusslich (Lampe, Briggs et al. 2007)

Antikörper-Bezeichnung	Verdünnung	Spezies	Herkunft
α -MLV.Env	1:3.000	Ratte	C. Buchholz, Paul Ehrlich Institute, Langen
α -MLV CA	1:4.000	Ratte	C. Buchholz, Paul Ehrlich Institute, Langen
α -mCherry	1: 250	Lama	Heinrich Leonhardt, LMU Munich
α -AGT	1:2.000	Kaninchen	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.7 Verwendete Plasmide

Name	Beschreibung	Hergestellt / erhalten von	Fluorophor / Tag
pCHIV	Proviraies Plasmid	(Bohne and Krausslich 2004) / Barbara Müller	-
pCHIV.eGFP	Proviraies Plasmid	(Muller, Daecke et al. 2004) / Barbara Müller	eGFP, C-terminal von MA
pCHIV.eGFP Δ Env	Proviraies Plasmid	(Lampe, Briggs et al. 2007) / Barbara Müller	eGFP, C-terminal von MA
pCHIV.CFP Δ Env	Proviraies Plasmid	(Lampe, Briggs et al. 2007) / Barbara Müller	CFP C-terminal von MA, vor Protease- Schnittstelle
pCHIV Δ Env	Proviraies Plasmid	(Lampe, Briggs et al. 2007) / Barbara Müller	-
peGFP.Vpr	Fluoreszenzmarkiertes Vpr-Fusionsprotein	(McDonald, Vodicka et al. 2002) / Barbara Müller	eGFP, N-terminal

Name	Beschreibung	Hergestellt / erhalten von	Fluorophor / Tag
pmCherry.Vpr	Fluoreszenzmarkiertes Vpr-Fusionsprotein	(Lampe 2007) / Marko Lampe	mCherry, N- terminal
pMM310	β -Lactamase-Vpr- Fusionsprotein für Fusionsassay	Nathaniel Landau	-
pVSVG	Plasmid kodierend für VSV-G (eingesetzt zur Pseudotypisierung von HI-Viren)	((Emi, Friedmann et al. 1991))	-
pMLV.Env	Plasmid kodierend für MLV.Env (eingesetzt zur Pseudotypisierung von HI-Viren)	(Kayman, Park et al. 1999) / Maik Lehmann	-
pMLV.Env.YFP	Plasmid kodierend für MLV.Env (eingesetzt zur Pseudotypisierung von HI-Viren)	(Sherer, Lehmann et al. 2003) / Maik Lehmann	YFP, innerhalb der SU-Domäne
pMLV.Env.mCherry	Plasmid kodierend für MLV.Env (eingesetzt zur Pseudotypisierung von HI-Viren)	Siehe 2.18.2	mCherry, innerhalb der SU- Domäne
pMDoldGag-Pol	Proviraies Plasmid für MLV-Partikel	Maik Lehmann Ursprung: Richard Mulligan	-
pMMP-LTR-LacZ	Reportergen	Maik Lehmann Ursprung: Richard Mulligan	-
pGPI.eGFP	GPI-Anker fusioniert mit eGFP	Barbara Müller / Marko Lampe	eGFP
pGPI-AGT	GPI-Anker fusioniert mit AGT	Covalys, Luzern (Schweiz)	-

2.8 Synthetische Oligonukleotide für PCR

Primername	Nukleotidsequenz (5'→3'):
MLV-H8D-fw	CGGCTCCAGCCCTCGCCAGGTCTACAAC
MLV-H8D-rw	GTTGTAGACCTGGCGAGGGCTGGAGCCG

2.9 Sterilisation

Medien für die Bakterienkultur wurden bei 121°C und einem Druck von 1 bar für 20 min autoklaviert. Waren Komponenten der Lösungen hitzelabil, so wurden diese unter sterilen Bedingungen durch einen Filter mit 0,22 µm Porengröße steril filtriert und anschließend dem Medium zugesetzt.

2.10 Bakterienkulturen

Für Bakterienkulturen in Flüssigmedium wurde Luria Bertani (LB)-Medium eingesetzt:

1,0 % (w/v) Bacto-Trypon
 0,5 % (w/v) Hefeextrakt
 170 mM NaCl
 5 mM NaOH

Der pH-Wert wurde auf 7,5 eingestellt und das Medium anschließend autoklaviert.

Für die Herstellung von LB-Agarplatten wurden dem LB-Medium 1,25 % (w/v) Agar zugesetzt, die Mischung autoklaviert und im noch flüssigen Zustand in 10 cm Schalen gegossen. Je nach Bedarf wurden im noch flüssigen Zustand Selektionsantibiotika zugesetzt. Die finale Konzentration bei Ampicillin betrug 100 µg/ml bzw. bei Kanamycin 50 µg/ml.

2.11 Bakterienstämme

Escherichia coli DH5

F-80d/*lacZ*M15 (*lacZ*YA-*argF*) U169 *recA1 endA1*
*hsdR*17(*r_K*-, *m_K*+) *phoA supE*44 - *thi*-1 *gyrA*96 *relA*1

2.12 Zelllinien

Name	Beschreibung	Verwendung	Herkunft
293T	Humane embryonale Nierenfibroblastenzelllinie, immortalisiert, transformiert mit großem T-Antigen von SV40	Virusproduktion (gute Transfizierbarkeit, hohe Proteinproduktion nach Transfektion)	ATCC ((Pear, Nolan et al. 1993), (Sena-Esteves, Saeki et al. 1999))
HeLaP4	HeLa-Zelle, u.a. stabil transfiziert mit CD4 und X4	Standardmodellzelllinie, Virus-Zell-, Infektionsexperimente	abgeleitet von HeLa ((Charneau, Alizon et al. 1992))
HeLa	Menschliche Cervikalkarzinom-Zelllinie	Kontrollzelllinie für Virus-Zell-Interaktionsexperimente	ATCC; ((Scherer, Syverton et al. 1953))
SupT1	CD4 und CXCR4 positive T-Zelllinie	Virus-Zell-Interaktionsexperimente (Virusbindung)	((Sei, Inoue et al. 1990))
DFJ-8	Hühnerepithelzellen (DF-1), mCat exprimierend	Interaktionsexperimente, Infektionsexperimente	W. Mothes, ((Scherer, Lehmann et al. 2003))

2.13 Nährmedien und Zusatzreagenzien

Name	Zusätze
DMEM high (Invitrogen) / FKS (BioWest)	2 mM Glutamin 50 U/ml Penicillin 50 mg/ml Streptomycin 10 % (v/v) FKS
RPMI (Invitrogen) / FKS (BioWest)	2 mM Glutamin 50 U/ml Penicillin 50 mg/ml Streptomycin 10 % (v/v) FKS

2.14 Technische Geräte

2.14.1 Allgemeine technische Geräte

Name	Hersteller	Verwendung
Bowman Series 2 Luminescence Spectrometer	Aminco, (USA)	Fluoreszenzspektren und – kinetiken
DU 640 Spectrophotometer	Beckman, Krefeld	Absorptionsspektren und DNS-Konzentrationsbestimmung
ELISA-Reader Multiscan EX	Thermo, Dreieich	Absorptionsmessung von 96-Loch-Platten für p24-ELISA
Sterilbank Steril Guard Class II Typ A/B 3	Labotec, Wiesbaden	Zellkulturarbeiten
Safire Platten-Fluorimeter	TECAN, Crailsheim	Fluoreszenzmessung von 96-Loch-Platten z.B. für - Lactamase-Fusionsassay
Tischzentrifugen Biofuge pico und fresco	Hereaus, Dreieich	Allg. Laborarbeiten (z.B. DNS-Aufreinigung)
UZ L8-60M Ultrazentrifuge mit Rotor SW28 und SW41	Beckman, Krefeld	Virusaufreinigung
XL-70 Ultrazentrifuge mit Rotor SW32 und SW60	Beckman, Krefeld	Virusaufreinigung
IX70 mit Monochromator	Olympus/Till Photonics, Hamburg	Allgemeine Fluoreszenzdetektion mit Zellen im Weitfeld
Konfokales Mikroskop Leica SP2 AOBS	Leica, Wetzlar	Konfokale Mikroskopie von Zellen
PCR-Maschine	Biometra, Göttingen	Amplifizierung von DNS zur Klonierung
semi-dry Blotting Apparatur	Biometra, Göttingen	Proteindetektion

2.14.2 Mikroskop

Die mikroskopische Arbeit wurde fast ausschließlich mit einem vollautomatisierten, inversen Mikroskop (Zeiss Axiovert 200M) mit motorischem Wechsel aller optischen Komponenten inkl. der Filterhalter durchgeführt. Das System wurde über die Software Metamorph gesteuert. Als Objektive standen ein Zeiss EC-Plan Neofluar 20x/0,5 DIC Objektiv und ein alpha Plan-Fluar 100x/1,45 DIC Öl-Immersionsobjektiv zur Verfügung. Dieses Objektiv lies auch TIRF-Messungen zu. Die Detektion erfolgte mit der EMCCD-Kamera Cascade II (RoperScientific), die 512 x 512 Pixel auflöste. Die vergleichsweise geringe Auflösung wurde durch die hohe Sensitivität der Kamera kompensiert (Quanteneffizienz bis zu 92% nach Herstellerangaben). Der

Mikroskoptisch ermöglichte präzise Positionierung in x und y mit Linearmotoren. Somit ist es möglich automatisch mehrere Positionen auf dem Deckglas nacheinander aufzusuchen. Die Anregung der Fluorophore ermöglichte die Fluoreszenzlichtquelle Sutter DG4. Dies war eine Lichtquelle mit multispektraler Xenon-Lampe, die mittels Flüssigkeitsleiter an das Mikroskop angeschlossen wird.

2.15 Software

2.15.1 Software für allgemeine Anwendungen

Adobe Photoshop 7.0

ImageJ Version 1.34

Invitrogen Vector NTI advance

Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint etc.)

Zeiss Free-Viewer

Universal Imaging Metamorph Vers. 6.3r7

2.15.2 Automatisiertes Tracking von Viruspartikeln

Kernstück der halbautomatisierten softwareunterstützten Auswertung stellte ein von Gruppe von Prof. Karl Rohr (Biomedical Computer Vision Gruppe, IPMB, Abteilung Bioinformatik & Funktionelle Genomik, Universität Heidelberg) speziell entwickelter Algorithmus dar. Ein entscheidender Vorteil des Algorithmus ist seine Anwendbarkeit auf die Rohdaten, ohne vorher die Daten auf andere Formate reduzieren zu müssen. Der Algorithmus ist über die Oberfläche des Programms ImageJ bedienbar.

Das Tracken der Partikel unterteilt sich im Tracking-Prozess in zwei Schritte:

(I) Auffinden der Viruspartikel in jedem Bild und (II) Verbinden der einzelnen Positionen zu einer Trajektorie, die die zeitliche Veränderung der Position eines Partikels beschreibt.

Im ersten Schritt wird das Rauschen durch einen Algorithmus im Bild reduziert. Signale unterhalb eines Schwellenwerts werden unterdrückt. Die Signale über dem Schwellenwert gelten als potentielle Virussignale. Über die Definition einer Reihe von Parametern wie Ausdehnung, minimale Helligkeit etc. ist es der Software möglich zwischen „echten“ Partikelsignalen und Störungen zu unterscheiden.

Im zweiten Schritt wird aus den einzelnen Positionen der Viruspartikel eine Trajektorie gebildet. Für die eindeutige Zuordnung der verschiedenen Viruspositionen zu der richtigen Trajektorie wurde der *Particle Filter* (ein komplexer *Kalman-Filter*) verwendet. Der *Kalman-Filter* ist ein auf dem Wahrscheinlichkeitsansatz beruhender Trackingalgorithmus, der auf mit linearen Gleichungen beschreibbare Systeme beschränkt ist. Partikelfilter (*Particle Filter*) erlauben hingegen die Anwendung komplexerer Modelle der Partikelbewegung. Im Fall des Virustrackings wurden drei verschiedene Bewegungsmodelle zugrunde gelegt: freie Diffusion, Bewegung mit konstanter Geschwindigkeit oder konstanter Beschleunigung. Auf deren Grundlage werden mögliche, aber falsche Positionen für eine Partikelposition ausgeschlossen.

Da die Partikelintensitäten ebenfalls vom Algorithmus bestimmt wurden, konnte das Verhalten der Intensitäten über die Zeit für einzelne Partikel verfolgt werden. Dies wurde für die Suche nach Farbtrennungseignissen herangezogen.

2.16 Molekularbiologische Methoden:

2.16.1 Transformation von Bakterien

Zur Vermehrung von Plasmiden wurden kompetente Bakterien eingesetzt. Diese wurden auf Eis für 15 min mit 1 µg des gewünschten Plasmids inkubiert und anschließend für 45 s im 42°C warmen Wasserbad einem Hitzeschock unterzogen. Nach Zugabe von 1 ml Antibiotika freien LB-Medium wurden die Bakterien für 45 min bei 37°C inkubiert. 100 µl dieser Bakteriensuspension wurden auf einer LB-Platte mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank belassen. Zum Ansetzen von Bakterienkulturen (siehe Präparation von Plasmid-DNS) wurden einzelne Kolonien von diesen Platten ausgewählt. Bei Bedarf wurden die Selektionsplatten bei 4°C für maximal 3 Wochen aufbewahrt.

2.16.2 Präparation von Plasmid-DNS:

Mini-Präparation: Zur Analyse von (aus Transformationen erhaltenen) Kolonien (z.B. von Ausstrichen von Plasmiden nach Klonierungen) wurden die Bakterien aus einzelnen Kolonien in 1 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum über Nacht unter aeroben Bedingungen bei 37°C unter Schütteln bis zu einer Trübung der Lösung von

etwa 0,5 in Absorptionsspektrometer (gemessen bei der Wellenlänge von 600 nm) vermehrt, für 3 min bei 13.000 Upm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 200 µl S1⁵-Resuspensionspuffer aufgenommen. Den resuspendierten Bakterien wurden 200 ml S2-Lysepuffer zugegeben und durch vorsichtiges Invertieren gemischt. Nach 4 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde den Proben 200 µl eiskalter S3-Neutralisierungspuffer zugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden 10 min bei 13.000 Upm zentrifugiert und die Überstände in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 480 µl Isopropanol und 5 min Inkubation auf Eis wurde die DNS ausgefällt. Mit Zentrifugation bei 13.000 Upm und 4°C für 10 min vom Überstand abgetrennt. Die Pellets wurden mit 4°C-kaltem 80%igem Ethanol gewaschen und das Pellet danach in 30 µl TE-Puffer aufgenommen.

Maxi-Präparation: Zur Herstellung größerer Mengen Plasmid-DNS wurden 200 ml Selektionsantibiotikum enthaltendes LB-Medium mit einer Kolonie der transformierten Bakterienkulturen versetzt und unter aeroben Bedingungen bis zu einer Trübung von 0,5 (Absorptionsmessung bei 600 nm) schüttelnd bei 37°C inkubiert. Durch Zentrifugation (5000 Upm, 15 min, 4°C) wurden die Bakterien pelletiert und in 12 ml S1-Resuspensionspuffer aufgenommen. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur mit 12 ml S2-Lysepuffer versetzt und durch fünfmaliges Invertieren gemischt. Nach 3 min wurde die Lyse durch Zugabe von 12 ml eiskalter S3-Neutralisierungspuffer gestoppt und 5 min auf Eis inkubiert. Zur Aufreinigung der DNS wurden Anionenaustauscherchromatographiesäulen mit 6 ml N2-Äquilibrationpuffer vorbehandelt. Die DNS-Proben wurden filtriert und das Filtrat auf die Säulen geladen. Im Anschluss wurden die Säulen mit 32 ml N3-Waschpuffer gewaschen. Die Proben wurden durch Zugabe von 15 ml N5-Eluierungspuffer von der Säule gelöst. Durch Zugabe von 11 ml Isopropanol und Inkubation auf Eis wurde die DNS ausgefällt und durch Zentrifugation (30 min, 15.000 x g, 4°C) von der Lösung abgetrennt. Das Pellet wurde in 300 µl TE-Puffer wieder aufgenommen. Durch Zugabe von 900 µl 100%igem Ethanol wurden die Proben ausgefällt, bei -20°C für 15 min inkubiert und erneut mittels 15 minütiger Zentrifugation bei 4°C und 13.000 Upm pelletiert. Das

⁵ Ausgenommen des TE-Puffers sind die Puffer in diesem Abschnitt Bestandteile des Nucleobond AX-Kits.

Pellet wurde in 300 µl TE-Puffer aufgenommen und die Konzentration und Reinheit der erhaltenen DNS photometrisch bestimmt.

2.16.3 Photometrische DNS-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNS wurde photometrisch durchgeführt. Dazu wurde der Hintergrund der Lösung durch Messung bei 320 nm gemessen. Die Reinheit der DNS wurde durch den Quotienten der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Bei Werten zwischen 1,75 und 1,9 wurde die Probe als ausreichend rein angesehen. Die DNS-Konzentration wurde durch die Absorption bei 260 nm abgeschätzt. Hierzu wurde angenommen, dass eine Absorption von 1 einer DNS-Konzentration von 1 mg/ml entspricht.

2.16.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNS-Strängen definierter Sequenz erfolgte mittels der PCR. Hierzu wurden 40 ng Template-DNS, je 40 pmol Vorwärts- und Rückwärtsprimer, 0,5 nmol dNTP-Mix und 1 U Pfu-Polymerase in einem Volumen von 20 µl Pfu-Puffer angesetzt.

2.16.5 DNS-Restriktion und Ligation

Zur Beurteilung der gewonnenen Plasmide auf ihre Richtigkeit wurden analytische Restriktionen durchgeführt. Hierzu dienten Enzyme von Fermentas. Diese Restriktionen wurden in einem Volumen von 15 µl durchgeführt. Für die analytischen Restriktionen wurden 1 µg DNS eingesetzt. Der Einsatz an Enzym richtete sich nach den Herstellerangaben.

Für präparative Proben wurden 2 µg DNS eingesetzt. Die Restriktionsbedingungen waren wie vom Hersteller angegeben gewählt. Um anschließende ungewollte Religierung an den Schnittstellen zu vermeiden, wurde im Anschluss das 5'-Ende dephosphoryliert. Hierzu wurde das Restriktionsprodukt in 40 µl mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm CIAP (*calf intestinal alkaline phosphatase*) für 30 min bei 37°C inkubiert (gemäß Herstellerempfehlung). Zur anschließenden Deaktivierung des Enzyms wurde die Probe für 15 min auf 65°C erhitzt.

Zur Ligation wurden etwa 30 ng DNS eingesetzt, wobei das molare Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:3 gewählt wurde. Die Bestimmung der DNS-Konzentration erfolgte jeweils im Ethidiumbromidgel durch Vergleich der erhaltenen Intensität der Probenbanden mit dem Molekulargewichtsmarker. Die Ligation wurde in einem Volumen von 15 µl mit Vektor, Insert und T4-DNS-Ligase (MBI-Fermentas) in T4-Ligasepuffer bei Raumtemperatur für 4 h durchgeführt. Zur Kontrolle wurde ein Vektor ohne Insert mitgeführt. Vom Ligationsprodukt wurde 1 µl zur Transformation von E.coli eingesetzt.

2.16.6 Elektrophoretische Separation von DNS

Zur Analyse von DNS Fragmenten wurden die jeweiligen Proben mittels eines 0,8%igen Argarosegels in TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Detektion der DNS wurde dem Gel 0,7 µg/ml Ethidiumbromid beigemischt. 10 µl DNS-Probe wurden mit 5 µl 3xSDS-Probenpuffer versetzt. Von diesem Volumen wurden 7 µl je Tasche aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für 45 min bei 80V durchgeführt. Zur Analyse der DNS-Fragmentgröße wurde ein 1kb-DNS-Molekulargewichtsmarker (Invitrogen) benutzt.

2.17 Plasmide

Da für die Beschreibung der Virusfusion die Verwendung von fusionskompetenten aber nicht zwingend von replikationskompetenten Viren erforderlich war, wurden die Plasmide pCHIV und pCHIV.eGFP verwendet. Es handelte sich hierbei um Varianten der exprimierenden Vorläuferkonstrukte pKHIV und pKHIV.eGFP (Bohne und Krausslich, 2004; Muller *et al.*, 2004). Für die Produktion von virusähnlichen Partikeln wurden Zellen mit diesen transfiziert. Vektor des pCHIVs ist das Plasmid pcDNA3.1(Zeo)-minus (Invitrogen). In der proviralen HIV-Sequenz des Plasmids pCHIV fehlt ein Großteil der LTR-Regionen, so dass nach Transfektion in 293T-Produzentenzellen die freigesetzten Viruspartikel keine funktionellen LTR-Regionen mehr aufweisen. Daher ist nach Eintritt in eine Zielzelle keine reverse Transkription mehr möglich und der Infektionszyklus somit unterbrochen.

2.17.1 Klonierung von pCHIV.MA.mCherry. PR(-).Env(-)

Zur Klonierung von pCHIV.MA.mCherry. PR(-).Env(-) wurde auf die beiden zuvor von Barbara Müller erzeugten Plasmide pCHIV.MA.mCherry.PR(-) und pCHIV.Env(-) zurückgegriffen. Beide Plasmide wurden einem zweifachen Restriktionsverdau durch die Restriktionsenzyme *AgeI* und *XhoI* unterzogen. Die so entstandenen Fragmente wurden mittels Elektrophorese in einem Agarosegel voneinander getrennt. Nach Extraktion aus dem Gel wurde das 5,1 kB Fragment des pCHIV.MA.mCherry.PR(-)-Verdaus mit dem 5,8 kB Fragment des pCHIV.Env(-)-Verdaus ligiert, in *E. Coli* transformiert und vervielfältigt. Das erhaltene Plasmid wurde durch erneuten Verdau und Analyse mittels eines Agarosegels auf seine Richtigkeit hin überprüft.

2.17.2 Klonierung von MLV.Env.mCherry

Zur Erzeugung einer fluoreszierenden Variante mit anderen Eigenschaften als das zuvor beschriebene Plasmid MLV.Env.YFP wurde auf das Klonierungsprotokoll von dem Plasmid MLV.Env.YFP zurückgegriffen. Dabei wurde in das Plasmid MLV.Env mittels *NheI* geschnitten und mit der *NheI* geschnittenen mCherry kodierende DNS ligiert. Das Produkt wurde in *E. Coli* transformiert und vervielfältigt. Das erhaltene Plasmid wurde durch erneuten Verdau und Analyse mittels eines Agarosegels auf seine Richtigkeit hin überprüft.

2.17.3 Klonierung von MLV.Env.mCherry.H8R

Zur Einbringung der Punktmutation H8R in das Env-Protein des MLV's wurde das Quickexchange Kit (Stratagene) verwendet. Für die PCR wurden die Primer MLV-H8D-fw und MLV-H8D-rw verwendet (siehe 2.9). Nach der PCR, Retransformation und Vervielfältigung in *E. Coli* wurden die erhaltenen Plasmide mittels Sequenzanalyse auf ihre Richtigkeit hin überprüft (GATC).

2.18 Zellbiologische und virologische Methoden

2.18.1 Zellkultur

Adhärente Zellen wurden in 75 cm² Schalen mit 10 ml des jeweiligen Kulturmediums kultiviert. DFJ-8-, DF-1-, 293T-, sowie HeLa Zellen wurden in DMEM gehalten.

Diesem wurde Glutamin, fötales Kälberserum (FKS) und Antibiotikum zugesetzt. Die Zellen wurden bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% Kohlendioxid kultiviert und alle 3-4 Tage subkultiviert. Hierzu wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin/EDTA (Invitrogen) vom Boden abgelöst. Die Trypsinaktivität wurde durch die Zugabe von DMEM-Vollmedium beendet. Ein Zehntel der Zellen wurde erneut ausgesät und mit 9 ml frischen komplettem Medium kultiviert.

Für bestimmte mikroskopische Fragestellungen (z.B. Darstellung einzelner Viren mit Zellen mittels eines 40x Objektivs) wurden DFJ-8 Zellen in DMEM ohne Phenolrot gehalten.

2.18.2 Cryokonservierung von Zelllinien

Zur Aufbewahrung von bestimmten Zellen wurden die jeweiligen Zellen während ihrer exponentiellen Wachsumsphase (entspricht einer ungefähren Zelldichte bei adhären Zellen von 75%) mittels Trypsinbehandlung in Suspension gebracht. 2×10^6 Zellen wurden in einem Cryo-Gefäß in einem Volumen von 1 ml aus 90%igem Voll-Medium mit 10% DMSO langsam auf -80°C abgekühlt. Zur Langzeitlagerung wurden die eingefrorenen Zellen in flüssigem Stickstoff überführt.

2.19 Biochemische Methoden

2.19.1 P24-ELISA

Der *Enzyme linked Immunosorbent Assay* (ELISA) dient der Quantifizierung von Proteinmengen. In diesem Fall wurde die Menge an Kapsidprotein p24 in Viruspräparationen bestimmt. Zu analysierende Proben wurden in SDS Probenpuffer für 10 min aufgekocht. Zur Analyse wurden die Proben in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Zum Auftragen auf die ELISA-Platte wurden die Proben in 1:5er Schritten verdünnt. Als Standard wurde rekombinant hergestelltes p24 in einer Menge von 6,25 ng bis 0,09 ng p24 je ml eingesetzt.

In eine 96-Loch-Platte (Immuno Maxisorb, Nunc) wurden 100 µl pro Loch Antikörperserum (1:1000-Verdünnung des Hybridoma-Überstands von Aszites 183,

der den monoklonalen Antikörper gegen p24 enthielt, in PBS) gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert.

Jedes Loch wurde zweimal mit 200 µl PBS/Tween gewaschen. Unspezifische Bindungsplätze wurden mit 150 µl 10% (v/v) FKS in PBS je Loch durch Inkubation für 2 Stunden bei RT blockiert. Nach zweimaligem Waschen der Platte mit 200 µl PBS/Tween wurden die vorbereiteten Probenverdünnungen aufgetragen. Die Platte wurde über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer belassen. Die Platte wurde zweimal mit PBS/Tween gewaschen und als zweiter Antikörper α -CA (1:10.000 Verdünnung in PBS mit 10% (v/v) FKS und 0,1% (v/v) Tween-20, polyklonales Kaninchenantiserum) aufgetragen und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS/Tween-20 wurden 100 µl je Loch mit an Meerettich-Peroxidase gekoppeltes Ziege- α -Kaninchen Antikörper aufgetragen und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit PBS/Tween-20 und einmal mit VE-Wasser gewaschen. Die Löcher der Platte wurden mit 100 µl ELISA-Färbelösung versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 0,5 M Schwefelsäure gestoppt. Die Platte wurde photometrisch bei 450 nm ausgelesen. Mit Interpolation innerhalb des linearen Bereichs des CA-Standard-Signals wurde die p24-Konzentration der Proben errechnet.

2.19.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine des Virus wurden mit Hilfe der SDS-Page Elektrophorese in einem niedrig vernetzten Acrylamidgel (*Low-Crosslinking* Gel) nach ihrer ungefähren Größe aufgetrennt.

Für ein standardmäßig verwendetes 17,5%iges Trenngel wurden 17,5 ml Acrylamidstammlösung (30:0,15%), 7,5 ml 4xTrennpuffer und 5 ml VE-Wasser gemischt und mit 250 µl APS und 50 µl TEMED zur Polymerisation gebracht. Das Sammelgel wurde mit 1,5 ml Acrylamidstammlösung (30:0,8%), 2,5 ml 4xSammelgelpuffer, 6 ml VE-Wasser, 50 µl APS und 5 µl TEMED gebildet (Trenn- und Sammelgelansatz wurden für vier Gele verwendet). Zur Polymerisation wurde zuerst das Trenngel zwischen zwei Glasplatten auspolymerisiert. Nach dessen Polymerisation wurde das Sammelgel auf diesem auspolymerisiert.

Zur Vorbereitung wurden zu analysierende Proben mit SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert. Die Proben wurden mit einer Hamilton Spritze auf das Sammelgel aufgetragen und eine Stromstärke von 15 mA an das Gel angelegt bis die Proben in das Gel eingedrungen sind. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Stromstärke auf 28 mA für 45 min erhöht.

2.19.3 Westernblot

Zum spezifischen Nachweis und zur Quantifizierung bestimmter Proteinspezies wurden Acrylamidgele elektrophoretisch auf eine Membran übertragen und auf dieser Membran mittels Antikörper nachgewiesen.

Hierzu wurden 9 Filterpapiere (Whatmann) in Westernblot-Puffer getränkt. Für ECL-Blots wurde eine Nitrocellulosemembran in Westernblot-Puffer getränkt. Für einen LiCor-Blot wurde eine FL-Membran für 30 s mit Methanol aktiviert, zweimal mit VE-Wasser für 5 min gewaschen und einmal in Westernblot-Puffer inkubiert. Auf der Kathode der Blotapparatur wurden die Filterpapiere aufeinander geschichtet, wobei das Gel auf die Membran zwischen dem 5. und 6. Filterpapier platziert wurde. Für eine Stunde wurde eine Spannung von 15 V angelegt. Zur Vermeidung unspezifischer Signale wurde die Membran mit 10%iger Milchpulverlösung in TBST für 30 min bei Raumtemperatur geblockt. Für die Bindung des ersten Antikörpers wurde die Membran kurz in TBST geschwenkt und mit 10 ml TBST, mit 2 % BSA und der entsprechenden Antikörperverschüttung bei 4°C über Nacht inkubiert. Zur Bindung des Zweitantikörpers wurde eine ECL-Membran dreimal mit TBST gewaschen und der entsprechende Sekundärantikörper in TBST mit 2 % BSA für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde dreimal in TBST für 15 min und einmal mit VE-Wasser für 5 min gewaschen und mit der Entwicklerlösung (ECL-Entwicklerlösung, Enhanced ChemLuminescence, Pierce) nach Herstellerangaben inkubiert. Erhaltene Signale wurden durch Exposition des Röntgenfilmes zu der Membran festgehalten. Röntgenfilme wurden entwickelt und fixiert.

Für die FL-Membran wurden die sekundären Antikörper 1:5.000 in 1:3 in TBST verdünntem LiCor-Blockpuffer verwendet. Nach einer Stunde Inkubation wurde die Membran zweimal mit TBST gewaschen und mit dem LiCor-System das Ergebnis festgehalten.

Antikörper	Verdünnung	Fluoreszenz
Esel α Kaninchen	1:5.000	700
Esel α Kaninchen	1:5.000	800
Esel α Ratte	1:5.000	800
Esel α Ziege	1:5.000	800

2.19.4 Viruspartikelproduktion und Aufreinigung

Zur Herstellung von fluoreszenzmarkierten Viruspartikeln wurden 293T Zellen mittels der Kalziumphosphatmethode mit subviralen Plasmiden transfiziert. 2×10^6 Zellen wurden pro 10 cm Schale am Vortag ausgesät und am Tag der Transfektion wie folgt behandelt: Pro Schale wurden 15 μg Gesamt-DNS in 50 μl 2,5 M CaCl_2 -Lösung gegeben und dieses mit ddH_2O auf 500 μl aufgefüllt. Dieses Gemisch wurde langsam in 500 μl 2 x HBS-Lösung unter ständigem Mixen zugegeben. Nach 20 min Inkubation wurde diese Lösung auf die Zellen getropft. Nach 12 Stunden wurde das Medium gewechselt und Überstände wurden nach 36 Stunden abgenommen. Vor der weiteren Aufreinigung wurden die Überstände durch Zentrifugation von Zellen und großen Aggregaten befreit. Die Überstände wurden mit einem Filter (0,45 μm Porengröße Membrex 25CA) filtriert. Das Medium wurde auf ein Sucrosekissen (20 % (w/w) in PBS) von 8 ml gegeben und für 2 Stunden bei 4°C und 24.000 Upm in einer Ultrazentrifugation (Rotor SW 28) zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Überstände vorsichtig abgegossen, Flüssigkeit am Rand des Gefäßes entfernt und das Pellet in 70 μl PBS resuspendiert. Die Virussuspension wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.19.5 Verhältnis der Plasmide bei einer Transfektion

MA-Env-doppelt markierte Partikel: Die Gesamtmenge an DNS wurde auf 16 μg pro 10 cm Schale beschränkt. Für die Produktion von MLV pseudotypisierten HIV-1 Partikeln wurden die Plasmide pCHIV Env(-) und pCHIV Env(-) MA.mCherry in einem molaren Verhältnis von 1:1 transfiziert. Zur Optimierung der MLV Env.YFP markierten Partikel wurde die MLV Env.YFP Plasmidmenge von 5 μg bis 14 μg variiert. Für die spätere Partikelproduktion wurde das Optimum für die

Signalintensität einzelner Partikel gewählt. Dies entsprach 8 μg pro 10 cm Schale (siehe 3.3.1, Abb. 3.7). Nach der Transfektion wurden die Überstände zu verschiedenen Zeitpunkten (12h, 16h, 24h, 32h, 48h) auf Partikelhelligkeit sowie MA- und Env-Signal Kolokalisation hin analysiert. Als beste Erntezeit für ein gutes partikuläres Fluoreszenzsignal wurde 32 h ermittelt (siehe 3.3.1).

Vpr-Env-doppelt markierte Partikel: Für die Vpr-Markierung wurde auf Ergebnisse von Marko Lampe zurückgegriffen ((Lampe 2007)) und ein molares Verhältnis von pCHIV zu Vpr von 7:1 gewählt. Für die Env-Markierung wurden die optimierten Transfektionskonzentrationen und Erntezeitpunkte aus der MA-Env-Doppelmarkierung gewählt.

IN-Env-doppelt markierte Partikel: Da zu diesem Plasmid keine eigenen Transfektionserfahrungen vorlagen, wurden hier die molaren Verhältnisse zwischen pCHIV und IN-Plasmid von 1:1 bis 10:1 variiert und die Auswirkungen zunehmender IN.GFP-Menge auf die Prozessierung von Gag mittels Western-Blot beurteilt. Dies wurde mit Auswirkungen der Vpr-Menge auf die Partikel verglichen.

Dreifachmarkierte Partikel (IN-MA-Env): Zur Erzeugung von dreifach markierten Partikeln wurden die molaren Verhältnisse von den jeweiligen Doppelmarkierungen übernommen. Verschiedene Zeitpunkte zur Virusernte (12h, 24h, 32h, 48h) wurden auf die Ausbeute an dreifach markierten Partikel im Überstand untersucht.

2.19.6 Mikroskopischer Viruseintrittversuch

Beschichtung der Deckgläser: Zur Darstellung der viralen Fusion auf Einzelpartikelebene wurden 8fach gekammerte Deckgläser mit 100 μl einer in gefiltertem PBS auf 100 $\mu\text{g/ml}$ eingestellten Fibronektin-Lösung bedeckt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung entfernt und die Deckgläser für 30 min bei 37°C inkubiert. Mittels eines Durchlichtmikroskops wurde der Zeitpunkt bestimmt, an dem die zuvor entstandene Fibronektinschicht auf dem Glas erste Anzeichen von Austrocknung zeigte. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Inkubation durch Zugabe von 200 μl gefiltertem PBS pro Kammer abgebrochen. So

beschichtete Kammern wurden entweder sofort zur Virusbindung eingesetzt, oder bei 4°C über Nacht gelagert.

Vorbinden der Viren: Auf die Fibronektin beschichteten Deckgläser wurden Partikel aufgetragen. Dazu wurden in das in den Kammern befindliche PBS 25 ng (nach p24-EIIISA) Viruspartikel zugegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Darauf wurden nicht gebundene Partikel durch Abnahme des PBS entfernt und diese durch 200 µl gefiltertes PBS ersetzt.

Vorbereiten der Zellen: Die hier verwendeten adhärenenten DFJ-8 Zellen wurden mittels Trypsinbehandlung (siehe Zellkultur) aus ihrer Zellkulturflasche gelöst und in DMEM/FKS die Trypsinierung gestoppt. Bis zum Einsatz im Versuch wurden die Zellen in einem 15 ml Falcon-Röhrchen bei 37°C und 5 % CO₂ aufbewahrt.

Die Inkubationskammer des Mikroskops wurde auf 37°C und 5 % CO₂ eingestellt. Der Fokus wurde auf die Schicht der vorgebundenen Viren eingestellt und der Versuch durch die Zugabe von 10.000 Zellen in den Überstand einer Deckglaskammer gestartet.

2.19.7 Messen des Eindringvermögens Viren in Zielzellen

Etwa 10.000 Zellen wurden in den Überstand gegeben. Alternativ wurden die Zellen am Tag zuvor ausgesät. Virus und Zellen wurden für 6 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, die Zellen einmal mit CO₂-unabhängigen Medium gewaschen und die Zellen für 12 Stunden mit der CCF2-Färbelösung bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden in 3%igem PFA für ein halbe Stunde bei Raumtemperatur fixiert. β-Lactamase-positive Zellen wurden im Fluoreszenzmikroskop ausgezählt.

Um die eingesetzte Menge und die tatsächlich an das Deckglas gebundene Menge an Virus zu bestimmen, wurde die Aktivität der Reversen Transkriptase sowohl in der initial eingesetzten Viruspräparation als auch nach der Virusbindung im Überstand der verbleibenden Lösung gemessen.

2.19.8 Bestimmung der Transduktionseffizienz von Viruspartikeln mit dem lac-Z-Reporter

10.000 Zellen wurden in einer Kammer eines gekammerten Deckgläschens ausgesät. Nach Western-Blot normalisierte Mengen von MLV-Partikeln, die das Reportergen *lac-Z* enthielten, wurden den Zellen zugefügt. Nach 48 Stunden Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wurden die Zellen mit 3%igem PFA für 30 min bei Raumtemperatur fixiert und über Nacht mit 200 µl β-Galaktosidase-Lösung inkubiert. Die Zahl der transfizierten Zellen wurde darauf im Durchlichtmikroskop bestimmt.

2.19.9 Mikroskopische Charakterisierung der doppelt fluoreszenzmarkierten Viren

Zur Charakterisierung der erhaltenen Partikelpopulation wurden die 5 µl einer Viruspräparation auf einem Fibronectin beschichteten Deckglas ausgesät. Die an die Oberfläche gebundenen Viren wurden mit denselben Mikroskopeinstellungen wie später die Eintrittsexperimente aufgenommen. Zur Bestimmung des Grades der doppelt markierten Partikel wurde mit Hilfe des Computerbildbearbeitungsprogramms ImageJ einzelne Partikel identifiziert. Um als Partikel identifiziert zu werden, musste die Intensität der Partikel mindestens 30 % der Standardabweichung des Rauschens über dem mittleren Hintergrund liegen. Um Aggregate von der Analyse auszuschließen, durfte die Partikelgröße maximal 20 Pixel betragen. Die Markierung der Partikelpopulation wurde in einem Dottblot durch Auftragung des Env-Signals gegen das korrespondierende MA.XFP-Signal dargestellt. Zur Bestimmung des Anteils der doppelt markierten Partikel an der Präparation wurde jedes Partikel darauf getestet, in welchen der Fluoreszenzkanäle es über der gesetzten Intensitätsschwelle lag. Der Grad der doppelt markierten Partikel wurde aus der Anzahl an doppelt markierten Partikel dividiert durch die Gesamtanzahl aller HIV-Signal-Punkte (meist: MA.XFP-Signale) errechnet.

Das Signal-Rausch-Verhältnis wurde ebenfalls mit Hilfe von ImageJ berechnet. Für die Höhe des durchschnittlichen Partikelsignals wurden die Intensitäten aller Partikel positiv für einen Kanal gemittelt. Das Rauschen wurde mit Hilfe von Excel aus einem 1000 Pixel großen, partikelfreien Abschnitt des Bildes errechnet. Dazu wurde die 1. bzw. 99. Perzentile aller Hintergrundintensitäten der ausgewählten Pixel als untere

bzw. obere Grenze des Rauschens angenommen. Das Rauschen ergab sich aus der Differenz der beiden Perzentilen.

2.19.10 Fluoreszenzmarkierung der viralen Membran durch Verwendung von fluoreszenzmarkierten Lipiden

Partikel wurden mit in DMSO aufgenommenen lipidgekoppelten Farbstoffen (Phosphatidylethanolamine-TMR, Sphingosine-NBD, Galactosyl Ceramid-NBD, C-16 Körper-Bodipy, DHPE-Texas red, GM1-Bodipy, Herkunft siehe Abschnitt 2.1) für 1 Stunde inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wurde von markierten HIV-Partikeln wieder über eine Zentrifugation durch ein Sucrosekissen getrennt. Die Rückgewinnung von Partikeln wurde mittels p24 Elisa bestimmt. Eigenschaften der markierten Partikel wurde mittels Mikroskopie bestimmt.

2.19.11 Markierung der viralen Membran durch Verwendung von Fluorophoren mit Hilfe von Membranankerpeptiden

Um ein von MLV.Env unabhängige Virusmembranmarkierung zu erhalten, wurden verschiedene, an Proteinanker gebundene Fluoreszenzmarkierungen getestet. Hierbei handelte es sich um an GPI gebundene eGFP bzw. das an GPI gebundene SNAP-Markierungssystem, mit dem es möglich ist, organische Fluorophore wie Axela oder ATTO-Farbstoffe kovalent an Membrananker zu binden.

3. Ergebnisse

Der Infektionszyklus von HIV-1 beginnt mit dem Eindringen des Partikels in die Wirtszelle. Bis heute ist nicht geklärt, ob der Eintrittsweg durch Fusion mit der Plasmamembran oder mit einer endosomalen Membran erfolgt. Die Dynamik des Fusionsprozesses ist in der Literatur noch kaum beschrieben. In dieser Arbeit wurde die Fusion mit fluoreszenzmarkierten Viruspartikeln untersucht. Einleitend wird in diesem Teil das System zur Virus-Zellfusion erläutert (3.1). Es schließt sich die Etablierung eines membranständigen Virusmarkers an. Dazu wurden Viruspartikel erzeugt und deren jeweilige Fluoreszenzmarkierung hinsichtlich der Markierungsqualität (Signal-zu-Rausch-Verhältnis) und -quantität (Kokalisation mit bereits charakterisierten Virusmarkern) sowie deren Auswirkung auf die Virusfunktionalität untersucht. Auf das zuletzt gewählte System – mit fluoreszenzmarkiertem MLV.Env pseudotypisierte HIV-1 Partikel – wird genauer eingegangen (3.3). Zur effizienten Detektion einzelner Virusfusionsereignisse wurde ein spezieller Versuchsaufbau gewählt. Dessen Eigenschaften hinsichtlich Möglichkeit und Effizienz der Infektivität wurden untersucht und leiten über zu der Beschreibung des Signalverlusts des viralen Membranmarkers aufgrund von Fusion während der Inkubation von Viren mit Zellen (3.7). Es folgt die Detektion der einzelnen Fusionsereignisse auf Einzelpartikelebene. Dabei werden die Eigenschaften der einzelnen Farbtrennungseignisse detailliert besprochen (3.8). Die Auswirkung und Änderung unterschiedlich markierter Virusproteine auf die Detektion von Farbtrennungseignissen bildet den Abschluss (3.9-10).

3.1 Fusionsdetektion

Um fluoreszierende Viruspartikel zu erzeugen, wurden während der HIV-Partikelproduktion in Zellen verschiedene an fluoreszierende Proteine gekoppelte HIV-Proteine zur Expression gebracht und so während der Gag-Assemblierung an der Plasmamembran in die Viruspartikel inkorporiert.

Dazu wurden zunächst die schon als Fusionspartner etablierten Virusproteine Vpr ((McDonald, Vodicka et al. 2002)), MA ((Muller, Daecke et al. 2004); (Lampe, Briggs et al. 2007)) und IN ((Albanese, Arosio et al. 2008)) verwendet. Eine Visualisierung der Fusion durch Kombination der markierten Virusproteine MA und Vpr war bereits versucht worden, wobei eine Trennung des membranassoziierten MA-Proteins von dem, im viralen Kern befindlichen, Vpr eine Fusion anzeigen sollte. Allerdings wurde so nur ein einziges Farbtrennungseignis gefunden ((Lampe 2007)). Die Eintrittseffizienz dieser Viren war hierbei nicht vermindert, sondern die Partikel zeigten im Gegensatz zu einfach markierten Partikeln eine erhöhte Stabilität. Es wurde gefolgert, dass aufgrund der erhöhten Stabilität der Virusstruktur Farbtrennungen nicht häufiger detektiert werden konnten. Da die Annahme, dass MA zum Zeitpunkt der Fusion quantitativ vom Rest des Partikels abfällt auf theoretischen Überlegungen aber nicht auf experimentellen Daten beruhte, mussten neue Ansätze gesucht werden.

Zur Visualisierung des Fusionsereignisses eines Viruspartikels wurde daher versucht, eine weitere Fluoreszenzmarkierung in die virale Membran einzubringen. Dazu wurden entweder fluoreszenzmarkierte Lipide mit Viruspartikeln inkubiert oder fluoreszenzmarkierte (-markierbare) Transmembranproteine zu einer Virusproduktion transfiziert. Per Definition muss diese während des Fusionsprozesses verloren gehen. Außerdem sind die Möglichkeiten der Wechselwirkung eines ausschließlich membrangebundenen Fluoreszenzmarkers mit Strukturen im Inneren des Virus weniger groß.

Um die Abhängigkeit der Farbtrennung von der Virusfusogenität zu zeigen, wurden im Verlauf dieser Arbeit zwei Arten von Partikeln mit verminderter Fusogenität als Kontrolle erzeugt. Zum einen wurde ein Hüllprotein, das durch die Punktmutation H8R in Hemifusion gehalten wird, verwendet ((Zavorotinskaya, Qian et al. 2004)). Eine Visualisierung der Fusion durch Kombination der markierten Virusproteine MA und Vpr war bereits versucht worden. Diese wurden durch Mutagenese hergestellt. Zur Verbesserung der Detektion des endgültig verwendeten Markers, einer fluoreszenzmarkierten Version des MLV.Env's, wurde der ursprünglich dort eingebrachte Fluorophor YFP durch mCherry ersetzt.

3.2 Strategien zur Fluoreszenzmarkierung der viralen Membran

Um einen spezifischen Marker für die Fusion zu erhalten, wurde versucht, die Virusmembran direkt zu markieren. Zum einen wurde die Inkorporation von fluoreszenzmarkierten Lipiden in aufgereinigten Viruspartikeln, zum anderen die Inkorporation von fluoreszenzmarkierten Lipiden bzw. mit Proteinankern gekoppelte Fluorophore während der Virusproduktion in transfizierten Zellen getestet. Dabei wurde eine Studie zugrunde gelegt, in der gezeigt wurde, dass in HIV-partikelproduzierenden Zellen fluoreszenzmarkierte Lipide wie Tetramethylrhodamin-Phosphatidylethylcholin mit den Orten der Gag-Assemblierung kolokalisieren ((Booth, Fang et al. 2006)). Im Zellüberstand konnten in dieser Studie auch Gag-haltige Partikel mit fluoreszenzmarkierten Lipiden gefunden werden.

3.2.1 Partikel mit fluoreszenzmarkierten Lipiden

Für die Markierung der Viren mit Lipiden wurden solche fluoreszenzgekoppelten Lipidspezies gewählt, von denen bekannt war, dass sie auch gehäuft in der nativen Virusmembran vorkommen ((Brügger, Glass et al. 2005)). Es wurden langkettige, fluoreszenzmarkierte Acylgruppen verwendet, Sphingosin sowie Phosphatidylethanolamine (PE) und GM1. Nach der Inkubation von MA.mCherry markierten HIV-Partikeln mit fluoreszierenden Lipiden wurden diese über eine Zentrifugation durch ein Sucrosekissen vom nicht eingebautem Farbstoff getrennt. Die Bestimmung der Menge der zurückgewonnenen Partikel erfolgte mittels p24 ELISA. Im Durchschnitt wurden etwa 80 % des eingesetzten Virus während der Aufreinigung ohne Lipide und DMSO wiedergewonnen. In Gegenwart von 1 % DMSO sank die Partikelrückgewinnung leicht von 80 % auf 75 % (bzw. 65 % bei Verwendung von 2 % DMSO im Ansatz) der eingesetzten Partikel. In der mikroskopischen Untersuchung wurden punktierte MA.XFP-Strukturen erhalten, die einer Partikelmenge pro Sichtfeld von 50 % im Vergleich zu den Ausgangspartikeln entsprachen. Bei weiterer Erhöhung der DMSO-Konzentration fiel die Menge der zurückgewonnenen Partikel deutlich ab. In Gegenwart einer DMSO-Konzentration von 5 % fiel die Ausbeute auf 20 % herab. Im Mikroskop zeigte sich, dass die verbliebenen 20 % p24 nur großen Aggregaten und sehr wenigen punktierten Fluoreszenzpartikeln (etwa 1/100 der Partikelanzahl vor Färbereaktion) entsprachen.

Daraus ergab sich für die Lipidmarkierung eine maximale DMSO-Konzentration von 2 %.

Die Charakterisierung der aufgereinigten Partikel erfolgte mit dem Mikroskop bezüglich Effizienz der Färbung mittels des erzielten Signal-zu-Rausch-Verhältnisses. Dieses Verfahren wurde gewählt, da hier zwischen schlecht abgetrennten und spezifisch gebundenen Fluoreszenzmarkern unterschieden werden kann. Die Aufnahmen wurden mit den Belichtungsbedingungen für *live cell* Experimente durchgeführt. Für die Berechnung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses wurden vier Aufnahmen gemittelt. Da das Signal-zu-Rausch-Verhältnis mit der Anzahl n der Messungen um den Faktor \sqrt{n} steigt, konnte das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der markierten Partikel in den gemittelten Aufnahmen bestimmt und auf das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der einzelnen Aufnahmen zurückberechnet werden. Dieses Vorgehen ermöglichte eine präzise Bestimmung der Partikelposition und -intensität auch bei schwacher Fluoreszenzmarkierung. Für die Berechnung wurde das Rauschen aus der Standardabweichung des jeweiligen Bildes bestimmt, die wiederum aus 100 Pixelintensitäten von der Mitte des Bildes ohne erkennbares Partikelsignal berechnet wurde. Für das spezifische Signal der Partikel wurden die markierten Partikel zunächst aus der Lokalisation des MA.XFP-Signals bestimmt. Als membranmarkierte Partikel wurden Partikel mit einem MA.XFP-Fluoreszenzsignal und einer Fluoreszenzsignalintensität des Lipids von mindestens 1,5 der Standardabweichung (in der gemittelten Aufnahme) gewertet. Die mittlere Intensität der Lipidmarkierung aller so identifizierten Partikel wurde berechnet. Von dieser wurde die gemittelte Hintergrundintensität abgezogen. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis wurde als der Quotient der bestimmten mittleren Signalintensität und der Standardabweichung berechnet. Bei der Verwendung von allen Lipiden außer GM1 lag das Signal-zu-Rausch-Verhältnis unter 3 (Tabelle 3.1).

Mit Bodipy GM1 wurde – als einziger Lipidmarkierung – ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 3,5 erzielt. Gleichzeitig lag in diesem Fall der Grad der doppelt markierten Partikel (MA.XFP-Lipid) bei 95 % (Abb. 3.1). Diese Markierung lieferte einen hohen Anteil fluoreszenzmarkierter Partikel mit hoher Signalintensität.

Tabelle 3.1: Mittleres Signal-zu-Rausch-Verhältnis von mit Lipiden markierten Partikeln

	C16-Bodipy	DHPE-Texas Red	Sphingosine-NBD	TMR-PE	GM1-Bodipy
0,05%	nd	nd	1,1	nd	1,2
0,1%	1,3	1,2	1,4	1,3	1,8
0,5%	1,6	1,7	1,9	1,4	2,3
1%	2,0	2,1	2,3	1,4	2,9
2%	2,4	2,4	2,8	1,7	3,5

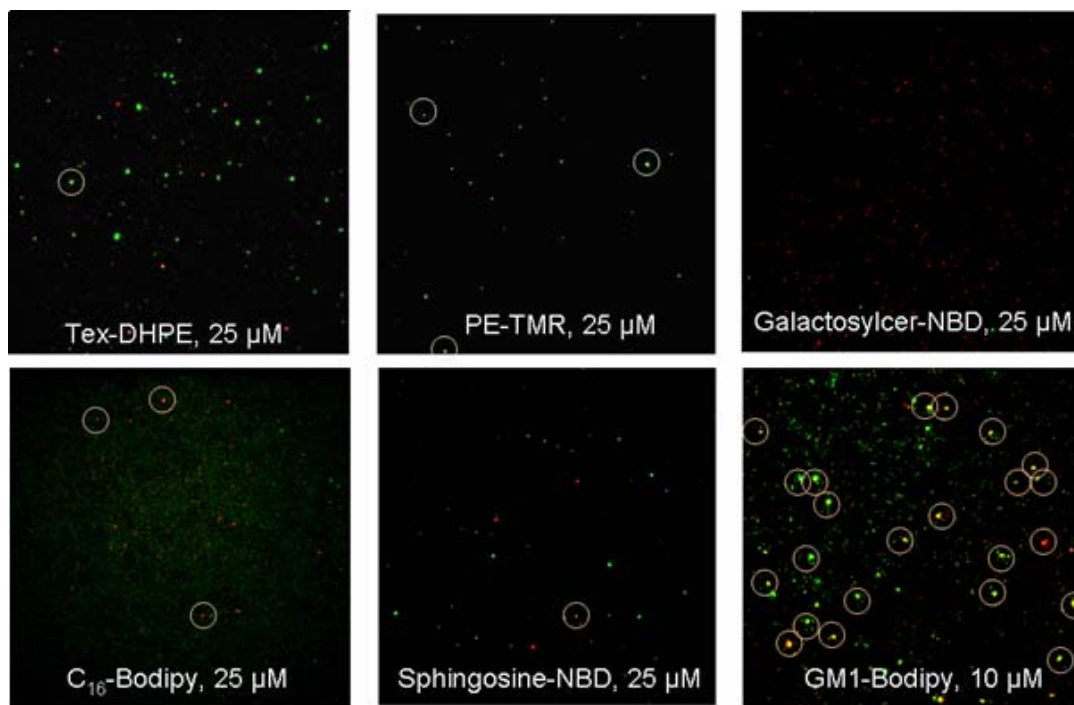


Abb. 3.1: Viruspartikel nach Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Lipiden. Viren mit entweder MA.mCherry oder MA.eGFP Markierung wurden mit verschiedenen Lipiden in der angegebenen Konzentration für 1 Stunde inkubiert und über eine Zentrifugation durch ein 20%iges Sucrosekissen aufgereinigt. Zur Analyse wurden diese in PBS auf ein Deckglas gegeben und mit dem Mikroskop auf ihre Fluoreszenzmarkierung untersucht. Lipidmarker wird immer in grün, MA immer in rot gezeigt. Partikel, die in beiden Fluoreszenzkanälen detektierbar waren, wurden mit einem gelben Kreis gekennzeichnet. Während die meisten Lipid-Signale nur schlecht mit dem Virussignal kolokalisieren, sind im Fall von GM1 fast alle Partikel, aber auch viele Vesikel (nur grünes Signal) gefärbt. Belichtungszeit: 250 ms.

3.2.2 Eintrittseffizienz GM1-markierter Partikel

Um die Auswirkungen der Inkorporation fluoreszenzmarkierter Lipide in die Virusmembran bzw. der Markierungsprozedur auf die Virusfunktionalität zu bestimmen, wurden Partikel mit inkorporiertem Vpr- β -Lactamase-Fusionsprotein erzeugt und nach der Markierung im β -Lactamase-Fusionsversuch eingesetzt (siehe Abschnitt 2.20.8). Dazu werden Zellen mit dem Farbstoff CCF2 beladen. Dieser besteht aus zwei Fluorophoren, die mit einer durch die β -Lactamase spaltbaren Verbindung aneinander gekoppelt sind. Der Abstand der Fluorophore ist dabei so gering, dass das Phänomen des strahlungslosen Energietransfers FRET auftritt. Ist nun ein Partikel des Zytoplasmas in eine mit CCF2 beladenen Zelle eingedrungen, spaltet die β -Lactamase die Verbindung zwischen den beiden Fluorophoren, so dass Zellen mit eingedrungenen Viren mit Hilfe des Verlusts an FRET-Signal detektiert werden können.

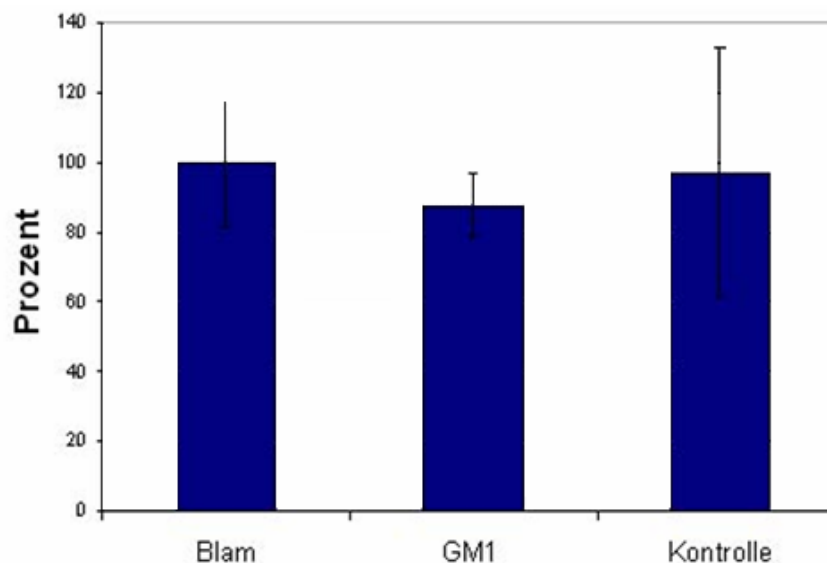


Abb.3.2: Eintrittsversuch mit GM1 markierten Partikeln. β -Lactamase-haltige Viren wurden mit GM1-Bodipy oder DMSO (als Kontrolle) inkubiert und aufgereinigt. Aufgereinigte Partikel wurden mit HeLa P4 Zellen inkubiert. Den Zellen wurde CCF2 (ein über β -Lactamaseschnittstelle aneinander gekoppeltes FRET-Paar) zugegeben. Die mit dem Virus in die Zelle eingedrungene β -Lactamase spaltet CCF2. Die resultierende Fluoreszenzänderung zeigt Zellen mit eingedrungenen Viren an. Verglichen wurden: nicht behandelte Viren, GM1-gefärbte Partikel oder mit DMSO behandelte Viren (Kontrolle). Werte wurden auf unbehandelte Viren normiert (100 %).

Für die Auswertung wurde das Intensitätsverhältnis der Emission im blauen Frequenzbereich (FRET-Transfer aufgehoben) ins Verhältnis zur Emission im grünen Frequenzbereich (FRET-Transfer) gesetzt. Es zeigte sich keine signifikante Verringerung der Eindringkompetenz von lipidmarkierten Viren gegenüber unbehandeltem bzw. mock-behandeltem Virus (Abb. 3.2).

3.2.3 Virus-Zell-Interaktion von GM1-markierten Partikeln

Um die Eignung GM1-markierter Partikel für *live cell* Experimente zu bestimmen, wurden die erzeugten Partikel mit Sup T1 Zellen inkubiert. Es zeigte sich innerhalb der ersten 30 min eine stark zunehmende Fluoreszenzmarkierung der Plasmamembran. Dieses Fluoreszenzsignal der Plasmamembran trat im gleichen spektralen Bereich wie die Lipidmarkierung der Partikel auf (Abb. 3.3). Um einen fusionsunabhängigen Übertritt des Farbstoffes vom Virus auf die Zelle auszuschließen, wurde das Experiment mit Partikeln in Gegenwart des Endozytoseinhibitors Eipa bzw. des HIV Fusionsinhibitors T20 wiederholt. Mit T20 zeigte sich nach einem Zeitintervall von 30 min eine starke Zellfärbung vergleichbarer Intensität wie in Abwesenheit des Inhibitors.

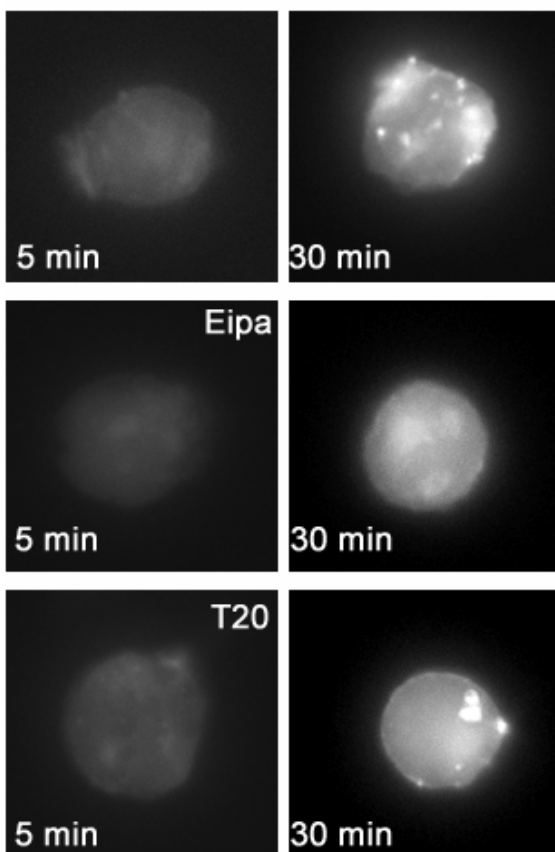


Abb.3.3: Plasmamembranfärbung während der Virus-Zellinkubation.

50 ng GM1 gefärbte Viruspartikel wurden in 100 µl zu den zuvor ausgesäten Sup T1 Zellen gegeben und mit diesen inkubiert. Mit der Zeit trat eine Plasmamembranmarkierung auf (obere Zeile). Zum Ausschluss von fusionsunabhängiger Färbung wurde das Experiment in Gegenwart des Endozytoseinhibitors EIPA und in Gegenwart des HIV-Eintrittsinhibitors T20 wiederholt. In beiden Kontrollen trat die GM1-Färbung in gleicher Geschwindigkeit und ähnlicher Intensität (nur im Fall von Eipa leicht verringert) auf wie mit Wildtyp-Partikeln in Abwesenheit des Inhibitors

Auch das Auftreten von fluoreszenzmarkierten Strukturen innerhalb der Zelle war unverändert. Für den Endozytoseinhibitor war die Signalintensität leicht verringert. Außerdem traten weniger inkorporierte, fluoreszenzmarkierte Strukturen auf. Da die Inhibition der HIV.Env vermittelten Fusion durch T20 keinen Unterschied in der Intensität der Sup T1 Zellen brachte, sprach dies für einen fusionsunabhängigen Übertritt des Lipidmarkers auf die Zellen.

3.2.4 Zellvermittelte Lipidmarkierung

Zur Generierung von lipidmarkierten Partikeln wurden Zellen mit pCHIV und pCHIV.MA.mCherry mit der Kalziumphosphatmethode transfiziert. Die fluoreszenzmarkierten Lipide wurden zu verschiedenen Zeitpunkten während der Partikelproduktion (12 h bzw. 1 h vor Mediumwechsel und erneut mit dem Mediumwechsel, mit dem Mediumwechsel, 1 h bzw. 12 h nach dem Mediumwechsel) zugegeben. Die Partikel wurden 32 Stunden nach der Transfektion geerntet und mittels Zentrifugation durch ein 20%iges Sucrosekissen aufgereinigt. Die erhaltenen Partikel wurden auf ihre Markierungseffizienz mit Hilfe des erzielten Signal-zu-Rausch-Verhältnisses auf Einzelpartikelebene beurteilt. Es zeigte sich, dass das erhaltene Signal-zu-Rausch-Verhältnis für alle verwendeten fluoreszenzmarkierten Lipidspezies bei einer Zugabe der Lipide 1 Stunde nach der Transfektion am höchsten war. Als maximale Lipidmixzugabe wurde 1 % toleriert. Damit wurde bei einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis von im besten Fall 2,1 eine nur geringe Markierungseffizienz erreicht. Der Anteil an doppelt markierten Partikeln lag zwischen 35 % und 55 %. Weil die erreichten Markierungseffizienzen nicht für Experimente unter *live cell imaging* Bedingungen ausreichten, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

3.2.5 Verwendung von GPI-gebundenen Fluorophoren

Eine andere Strategie zur Markierung der Virusmembran stellt die Kotransfektion von einem an einen Membrananker gekoppelten Fluorophor wie eGFP mit HIV-1 kodierenden Plasmid dar ((Campbell, Perez et al. 2007)). Dazu wurden 293T-Zellen mit den viralen Plasmiden und dem für das Fluorophor kodierenden Plasmid kotransfiziert. Sowohl das Verhältnis an viralem Plasmid zu fluoreszenzmarkiertem Ankerplasmid, als auch die Zeit der Partikelernte wurden variiert. Als Optimum wurde

ein Überschuss an Ankerplasmid zu HIV-Plasmid von 2:1 bei einer Erntezeit von 24 Stunden nach der Transfektion bestimmt. Eine weitere Erhöhung des Ankerproteins führte zu einer starken Verringerung der Partikelproduktion, bestimmt mittels p24 Konzentration. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis lag im besten Fall für GPI.eGFP bei 2,6 (Tabelle 3.2).

Um das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Ankerproteinmethode weiter zu erhöhen, wurden organische Fluorophore mit einer deutlich höheren Quantenausbeute und Photostabilität gegenüber fluoreszierenden Proteinen an die Membran gekoppelt. Dazu wurde bei der Transfektion von pCHIV und pCHIV.MA.eGFP auch das Plasmid GPI.SNAP transfiziert. SNAP stellt eine Markierungsmethode dar, die auf der Reaktion der Andenyl-Guanyl Aminotransferase (AGT) basiert. Das wt-Enzym transferiert die Amingruppe von einem Guanyl auf ein Protein. Eine veränderte Form der AGT wird an das Zielprotein eingebracht und mit ihm exprimiert. In Gegenwart von speziellen guaninartigen Substraten wird die normalerweise ablaufende Transferasereaktion an dem Zwischenschritt angehalten, an dem Substrat und Protein kovalent miteinander verbunden sind. Ist das Substrat z.B. an einen organischen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, kann das Zielprotein zu einem beliebigen Zeitpunkt fluoreszenzmarkiert werden. Die erhaltenen Partikel wurden wie zuvor aufgereinigt. Die Inkorporation des fluoreszierenden Membranankers in das Viruspartikel wurde mittels Western-Blot analysiert (Abb. 3.4). Mit Zunahme der Menge an GPI.SNAP-Plasmid in der Transfektion nahm auch die Menge GPI-SNAP im aufgereinigten Überstand zu.

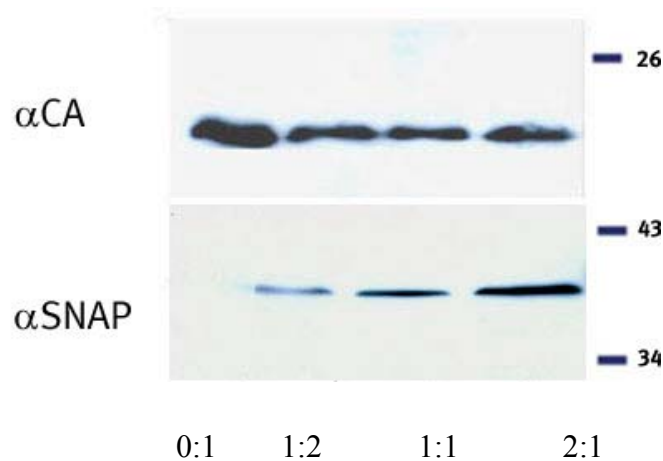


Abb. 3.4: Westernblot aufgereinigter Zellüberstände nach Virusproduktion in Gegenwart von GPI.SNAP. Mit Zunahme des GPI.SNAP-Plasmids (als molares Verhältnis zu HIV-Plasmid-DNS 0:1, 1:2, 1:1, 2:1) im Transfektionsmix nimmt die Inkorporation des GPI.SNAPs in die Partikel zu. Markerbanden in kDa. Vier verschiedene molare Verhältnisse von GPI.SNAP zu den HIV-Plasmiden sind hier dargestellt.

Tabelle 3.2: Signal-zu-Rausch-Verhältnis unter Verwendung von mit Proteinankern markierten Partikeln

	GPI-eGFP	GPI-SNAP-BG-ATTO 647N
1:8	1,5	nd
1:4	1.9	1.8
1:2	2.1	3.7
1:1	2.6	4.6

Nach Färbung mit dem BG.ALEXA488-Substrat fand sich eine Fluoreszenzmarkierung der Partikel, deren Helligkeit (Signal-zu-Rausch-Verhältnis) mit Zunahme der GPI.SNAP-Menge in der Transfektion ebenfalls anstieg (Tabelle 3.2).

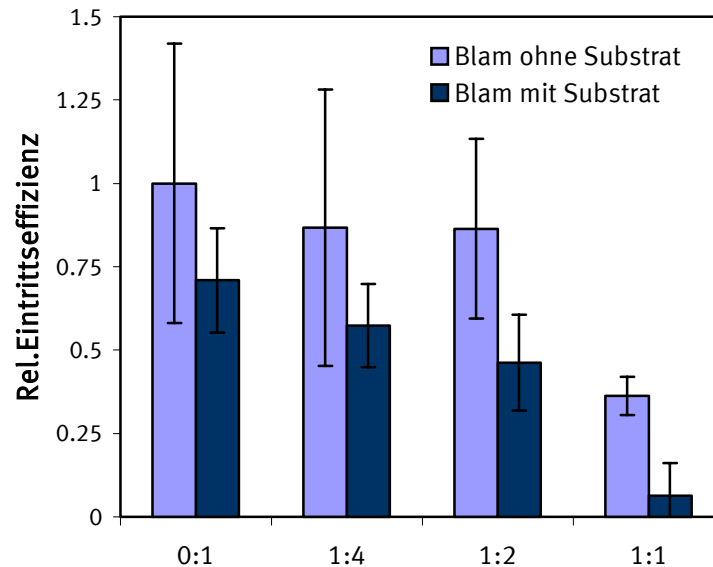


Abb. 3.5: Eintrittseffizienz von GPI.SNAP-markierten Partikeln: Unterschiedliche Mengen an SNAP-Plasmid wurden in einer Partikelpräparation den für Virus kodierenden Plasmiden zugemischt. Die Verhältnisse entlang der X-Achse zeigen die molaren Verhältnisse von eingesetzter Plasmidmenge GPI-SNAP zu pCHIV. Die Partikel wurden anschließend mit SNAP-Substrat (dunkelblau) oder nur dem gleichen Volumen DMSO inkubiert (hellblau).

Um eine Auswirkung der Markierung auf die Eintrittseffizienz des Virus auszuschließen, wurden Partikel mit inkorporiertem Blam.Vpr und GPI-SNAP erzeugt und deren Eintrittseffizienz mit Partikeln ohne GPI-SNAP verglichen. Die Inkorporation des GPI-SNAPs in die virale Membran hatte bis zu einem molaren Verhältnis während der Transfektion von GPI-SNAP zu pCHIV von 1:2 nur einen marginalen Effekt. Bei einem Transfektionsverhältnis von 1:1 fiel die Eintrittskompetenz auf weniger als die Hälfte des Ursprungswertes ab. Die Inkubation mit dem Substrat bei 4°C für 12 Stunden verringerte die Eintrittseffizienz um 30 %. Bei einem molaren Verhältnis von 1:1 reduzierte sich die Eintrittskompetenz auf weniger als 5 % des Ursprungswertes. Es zeigte sich, dass hohe Konzentrationen an GPI-SNAP zu einer signifikanten Reduktion des Eindringvermögens führten (Abb. 3.5).

Die Partikel, hergestellt mit einem molaren Plasmidverhältnis von 1:1 von GPI.SNAP zu HIV, wurde mit HeLa P4 Zellen inkubiert und mit Hilfe der automatischen Trackingsoftware von der Arbeitsgruppe Karl Rohr (Bioquant. Heidelberg) analysiert. Diese war speziell für das Tracken von Viruspartikeln entwickelt worden. Das Tracken der Partikel unterteilte sich im Tracking-Prozess in zwei Schritte:

(I) Auffinden der Viruspartikel in jedem Bild und (II) Verbinden der einzelnen Positionen zu einer Trajektorie, die die zeitliche Veränderung der Position eines Partikels beschrieb (siehe auch 2.16.2). Die erzielte Markierungseffizienz der Partikel reichte aus, um diese Partikel gegen den zellulären Hintergrund zu verfolgen (Abb. 3.6, CD-Filme 1-4).

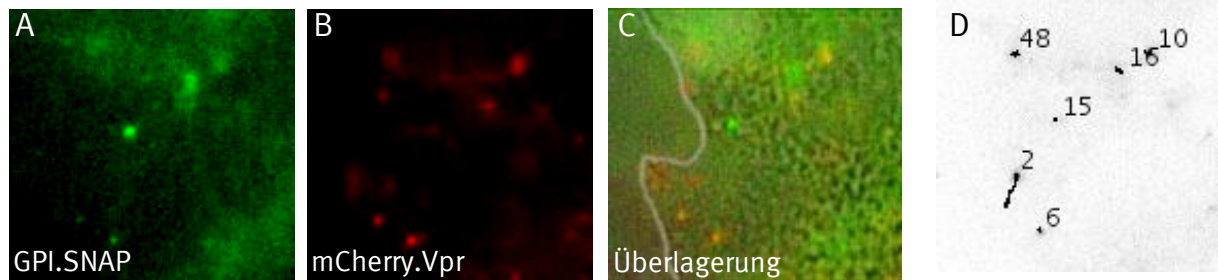


Abb. 3.6: Live cell imaging von GPI.SNAP-markierten (A) und mCherry.Vpr markierten (B) HIV Partikeln, inkubiert mit HeLa P4 Zellen. Die meisten Partikel waren während der Beobachtung (5 min) immobil an die Zelle gebunden, nur eines zeigte gerichtete Bewegung (D, Track 2). Der Film wurde mit der Trackingsoftware der AG Karl Rohr analysiert A) GPI.SNAP, Grüner Kanal zum Zeitpunkt 0; B) mCherry.Vpr, roter Kanal, zum Zeitpunkt 0; C) Überlagerung aus Hellfeld, mit Fluoreszenzsignalen aus beiden Kanälen, zum Zeitpunkt 0) Partikel wurden automatisch lokalisiert über 64 s. verfolgt. D) Erhaltene Trajektorien aus der Trackingsoftware, zeigt die Bewegung eines Partikels Nr 2).

3.3 Verwendung von MLV.Env Pseudotypen

Die durch GPI.SNAP erhaltene Membranfärbung war zwar ausreichend für *live cell imaging*, fusionsanzeigende Farbtrennungseignisse wurden jedoch nicht detektiert. Ein limitierender Faktor bei der Suche nach Fusionsereignissen mit HIV-Partikeln ist die geringe Fusogenität des HIV Hüllproteins. Es wurde daher auf die Strategie des Pseudotypisierens der HIV-Partikel mit fusogenerem MLV Hüllprotein zurückgegriffen. Dieses Vorgehen brachte zwei Vorteile. Erstens wurde die Wahrscheinlichkeit, im Beobachtungszeitraum Fusionsereignisse zu detektieren, durch die erwähnte höhere Fusogenität gesteigert. Zweitens existierte mit dem MLV.Env.YFP ein Hüllprotein, das trotz des eingefügten Fluoreszenzproteins seine Fusogenität nicht verlor. Es konnte daher gleichzeitig als Fluoreszenzmarker der viralen Membran dienen.

3.3.1 Optimierung der Pseudotypisierung von MA.mCherry HIV-1 Partikeln mit MLV.Env.YFP

Für die Erzeugung von sowohl quantitativ als auch qualitativ gut für *live cell imaging* geeigneter doppelt markierter HIV-1 Partikeln wurden pCHIV, pCHIV.MA.mCherry mit MLV.Env.YFP kotransfiziert. Da die optimalen Bedingungen für die Markierung der Matrix bekannt waren ((Muller, Daecke et al. 2004)), wurde hier die beste Plasmid-Konzentration von MLV.Env.YFP für die Kotransfektion in Hinblick auf die Markierungseffizienz der pseudotypisierten Partikel untersucht. Zuerst wurde die relative Menge an Env zu pCHIV in einem Bereich von 1:6,5 bis zu 7:1 variiert. Zur Beurteilung der Markierungseffizienz wurde die Partikelpopulation auf den relativen Anteil an doppelt markierten Partikeln zu allen MA markierten Partikeln und das jeweilige Signal-zu-Rausch-Verhältnis der beiden Markierungen untersucht (Abb. 3.7 und 3.8).

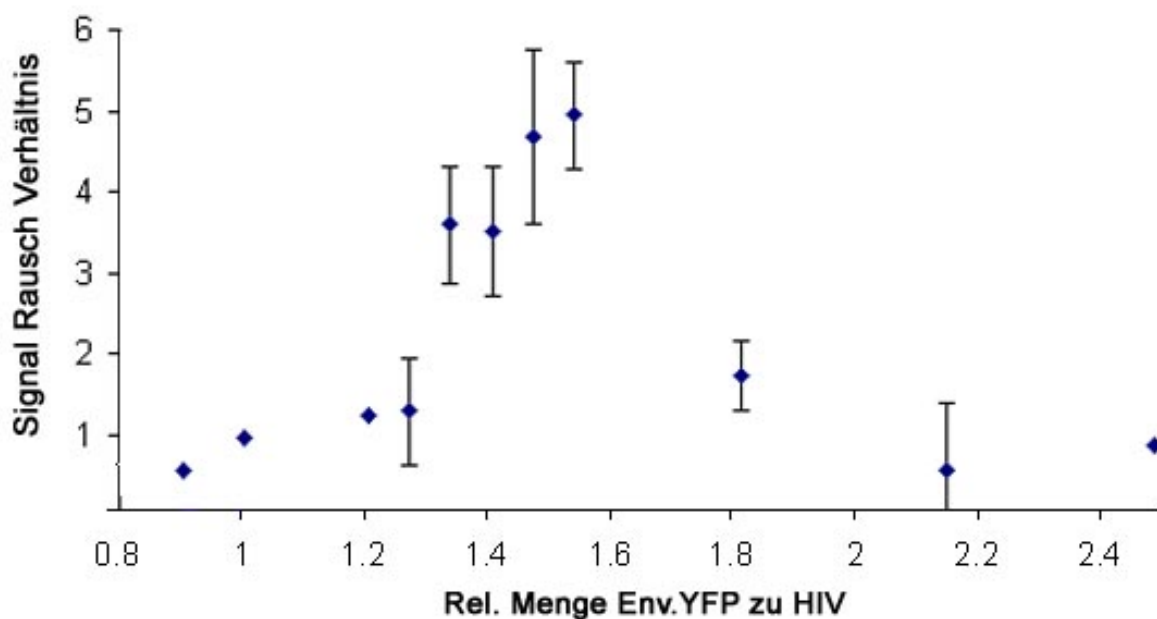


Abb. 3.7: Signal-zu-Rausch-Verhältnis von MLV.Env.YFP markierten Viruspartikeln: Partikel wurden durch Transfektion in 293T-Zellen erzeugt und aus dem Zellüberstand aufgereinigt. Angegeben auf der x-Achse ist das Verhältnis von der in der Transfektion verwendeten molaren Menge an Env.YFP zur Menge an HIV-Plasmiden. Die y-Achse zeigt das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Partikel. Es zeigt sich ein Maximum bei einem molaren Verhältnis von ungefähr 1.5 MLV.Env zu HIV-Plasmid-DNS. Um das Maximum wurden die Konzentrationen in Triplikaten wiederholt.

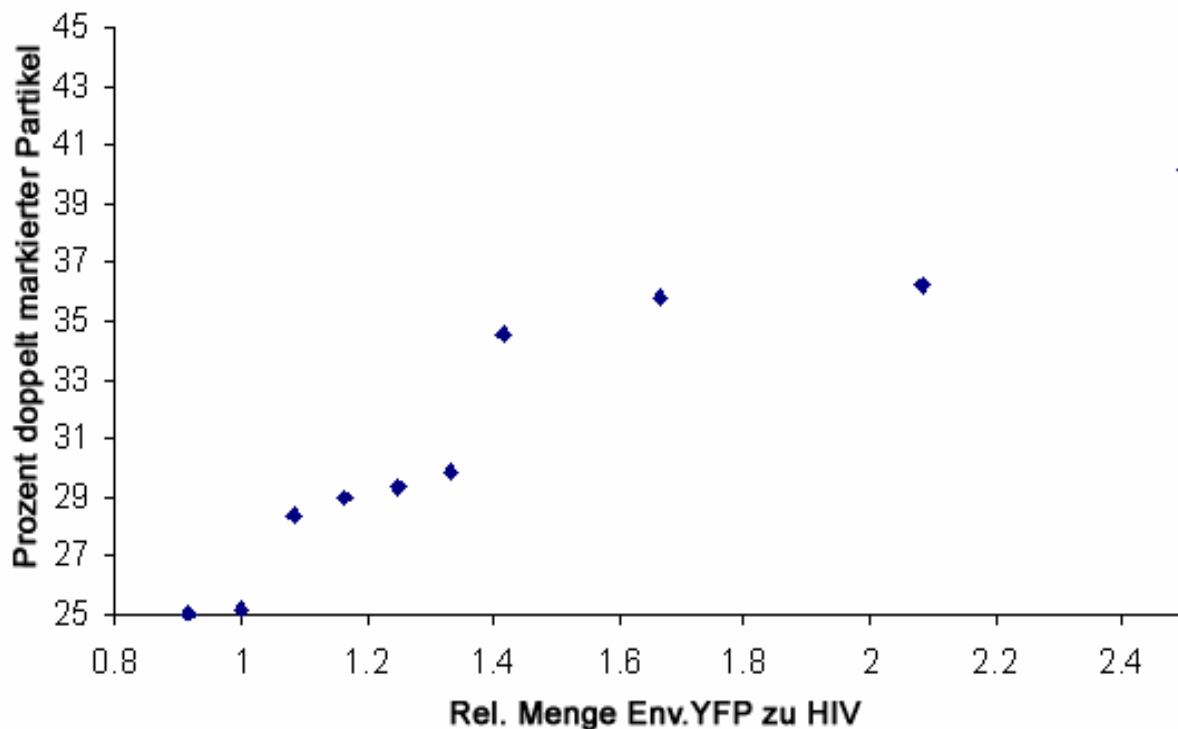


Abb. 3.8: Anstieg der Doppelmarkierung mit Zunahme des Env.YFP in der Transfektion (molares Verhältnis von Env.YFP zu HIV-Plasmiden), Partikel wurden aus dem Überstand transfizierter 293T-Zellen aufgereinigt. Angegeben auf der x-Achse ist das Verhältnis von der in der Transfektion verwendeten molaren Menge an Env.YFP zur Menge an HIV-Plasmiden. Die y-Achse zeigt den Anteil YFP- (Env) und mCherry-(MA)-positiver punktierter Strukturen zu allen mCherry-positiven punktierten Strukturen in Prozent. Die relative Menge doppelt markierter Partikel nimmt dabei kontinuierlich zu.

Es ergab sich ein Maximum der Partikel-Helligkeit bei einem Verhältnis von MLV.Env zu pCHIV von 2:1 (Abb.3.7). Die relative Anzahl an doppelt markierter Partikel zeigte kein Optimum bei dem Plasmid-Verhältnis von 2:1 (Abb. 3.8). Hier stieg die relative Zahl doppelt markierter Partikel mit zunehmender Menge von MLV.Env-Plasmid kontinuierlich an. Gleichzeitig fiel die Menge an gewonnenen Partikeln mit der Menge an Env in dem Transfektionsmix ab. Da sich die erzielte Partikelintensität als limitierender Faktor für die Mikroskopie erwies, wurden die optimalen Bedingungen für die Partikelintensität gewählt. Im Anschluss wurde der Einfluss der Transfektionszeit bis zum Zeitpunkt der Ernte bestimmt. Hierzu wurden die Zellüberstände aus den Transfektionen zu den Zeitpunkten 12 h, 24 h, 32 h und 48 h nach Transfektion geerntet und erneut die Population auf Helligkeit und Doppelmarkierung hin überprüft.

Um einen Einblick in die Funktionalität der Partikel zu erhalten, wurden für die gewählten Transfektionsbedingungen die Gag-Prozessierung mittels Western-Blott (Abb. II.2.2) und die Eintrittseffizienz des Virus in Zielzellen überprüft.

Für die Abgabe des Env-Proteins in den Zellüberstand ergab sich ein Maximum bei 24 h nach Transfektion. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis betrug dabei 5,6 für die MA.mCherry-Markierung und 3,3 für die Env-Markierung. Die matrixmarkierten Partikel zeigten dagegen das höchste Signal-zu-Rausch-Verhältnis bei 48 h nach Transfektion. Für die doppelt markierten MA.mCherry Partikel wurde daher als Kompromiss eine Erntezeit von 32 h gewählt.

Da es sich bei YFP um ein sehr bleichanfälliges Fluorophor handelt, wurde dieses im Anschluss durch mCherry im MLV.Env-Plasmid ersetzt. Nach erfolgreicher Klonierung des MLV.Env.mCherry wurde dieses zur Erzeugung von doppelt markierten Partikeln verwandt. Dabei wurde mit dem MLV.Env.mCherry und pCHIV.MA.eGFP ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 4,6 (Env) bzw. 5,9 (MA) erreicht. Gleichzeitig verbesserte sich der Anteil an doppelt markierten Partikeln leicht von 35 % auf 40 %.

3.3.2 Markierungseffizienz von MLV.Env pseudotypisierter HIV-Partikeln mit anderen fluoreszenzmarkierten HIV Proteinen

Desweiteren wurde versucht, anstelle des fluoreszierenden MA-Fusionsproteins die HIV Proteine mCherry.Vpr und IN.eGFP in die MLV.Env.mCherry pseudotypisierten Partikel einzubringen. Dazu wurden die in 3.3.1 ermittelten optimalen Plasmidkonzentrationen für MLV.Env.mCherry und pCHIV verwendet. Es wurden wieder verschiedene Erntezeiten getestet. Die Vpr-Markierung zeigte schon bei 24 h ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Daher wurden die Partikel mit dieser Markierung schon nach 24 h geerntet. Das endgültige Signal-zu-Rausch-Verhältnis lag bei 4,9 für MLV.Env und bei 5,4 für mCherry.Vpr. Durch einen Austausch der Konstrukte von MLV.Env.YFP zu MLV.Env.mCherry und mCherry.Vpr zu eGFP.Vpr konnte das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Env-Markierung auf 5,1 gesteigert werden. Auch hier führte der Austausch zu einem Anstieg der doppelt markierten Partikel (von 40 % auf 45 %).

Im Folgenden wird bei einem Bezug auf ein Protein, das mit einem von verschiedenen möglichen Fluorophoren markiert war (z.B. mCherry.Vpr oder eGFP.Vpr), eine Abkürzung als XFP vorgenommen (z.B. XFP.Vpr).

Im Falle der Vpr.IN.eGFP stand nur das MLV.Env.mCherry als Membranmarkierung zur Verfügung. Es wurde das Verhältnis der Plasmide codierend für MLV.Env und pCHIV übernommen. Die Erntezeit wurde wieder zu den angegebenen Zeiten getestet. Es zeigte sich, dass die IN.eGFP-Markierung schon nach 24 h ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis ergab (Env: 5,0; IN: 6,2), daher wurden die Partikel bei dieser Markierung bereits nach 24 h geerntet. Der Prozentsatz an doppelt markierten Partikeln betrug 45 %.

Um auf eventuelle Auswirkungen der Markierung auf die Partikelprozessierung rückzuschließen, wurde die Prozessierung des Gag-Polyproteins mittels Western-Blot gegen CA in allen Partikelpräparationen überprüft. Hierfür wurden die Intensitäten der einzelnen Banden in einem LiCor-Blot bestimmt und der lokale Hintergrund von diesen abgezogen (Abb. 3.9). Die hintergrundkorrigierte Bande bei 24 kDa wurde durch die unprozessierte Gag-Spezies bei 55 (und im Falle der markierten MA.XFP auch des Gag.eGFPs bei 83 kDa) geteilt. Dieser Quotient gab Aufschluss über den Grad der Prozessierung und sollte durch die jeweilige Markierung möglichst unbeeinflusst, das heißt möglichst groß sein. Für die am Ende gewählten Bedingungen ergab sich ein Quotient von 20. Dies wurde für ausreichend beurteilt und die Partikel daher so verwendet.

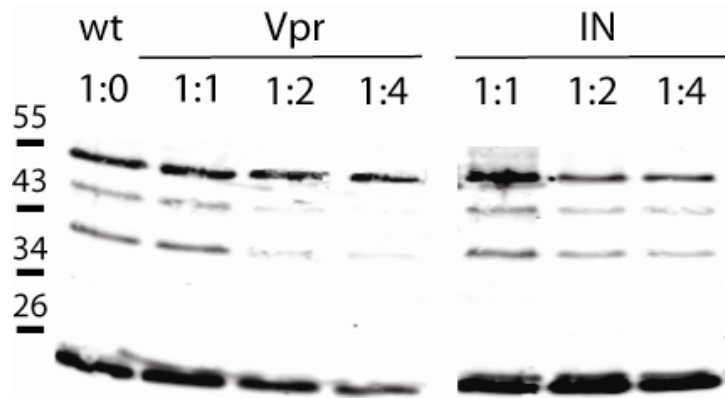


Abb. 3.9: Immunoblot Analyse von aufgereinigten Partikeln. pCHIV Partikel, kotransfiziert mit unterschiedlichen molaren Verhältnissen der Plasmide mCherry.Vpr (links) oder Vpr.In.eGFP (rechts) wurden mittels Zentrifugation durch Sucrosekissen von einer 293T Kokultur aufgereinigt. Gleiche Volumen der Proben wurden mittels SDS-PAGE (12.5 % Acrylamid) aufgetrennt, nach der im Methodenteil beschriebenen Standardmethode auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Proteine wurden mittels des quantitativen Immunoblotsystems von LiCor mit Antiseren gerichtet gegen CA bestimmt.

3.4 Charakterisierung der Virus-Eintrittseffizienz für *live cell imaging*

Um die Fusion auf Einzelpartikelebene zu detektieren und gut quantifizieren zu können, wurden die Viren auf eine Fibronektinschicht gebunden und anschließend die Zellen auf diesen ausgesät. Dieses Vorgehen hatte folgende Vorteile: Alle Partikel befanden sich zu Anfang der Messung in der Beobachtungsebene, was die Wahrscheinlichkeit erhöhte, eine Fusion an der Plasmamembran zu beobachten. Gleichzeitig konnten quantitative Aussagen über die Anzahl der Partikel-Zell-Wechselwirkungen gemacht werden. Außerdem stellte der Moment des Bodenkontakts der Zelle den Startpunkt der Virus-Zell-Interaktion dar, so dass deren Dauer gemessen werden konnte. Um Auswirkungen auf die Fitness des Virus, verursacht durch die Pseudotypisierung und Fluoreszenzmarkierung des Virus, zu überprüfen, wurde sowohl die Infektivität als auch die Eindringkompetenz des MLV.Envs untersucht. Gleichzeitig sollten mögliche Auswirkungen des experimentellen Vorgehens (Binden der Viren und Zugabe der Zellen) getestet werden. Es wurde zunächst untersucht, ob die im Virusgenom enthaltenen Proteine, von an Fibronektin gebundenen Viruspartikeln ihre Gene zur Expression bringen

können. Hierfür wurde die Transduktionseffizienz dieser Partikel relativ zu ungebundenen Viruspartikeln bestimmt. Dazu wurden verschiedene MLV-Partikel mit dem Reporter *lac-z* hergestellt. Diese trugen entweder das wt MLV.Env, das fluoreszenzmarkierte MLV.Env.YFP, die fusionsdefiziente Hüllprotein-Variante MLV.Env.YFP.H8R oder waren hüllprotein-defizient. Die Konzentrationen der MLV-Partikel wurden über die Gag-Bande im Westernblott abgeschätzt (hier nicht gezeigt).

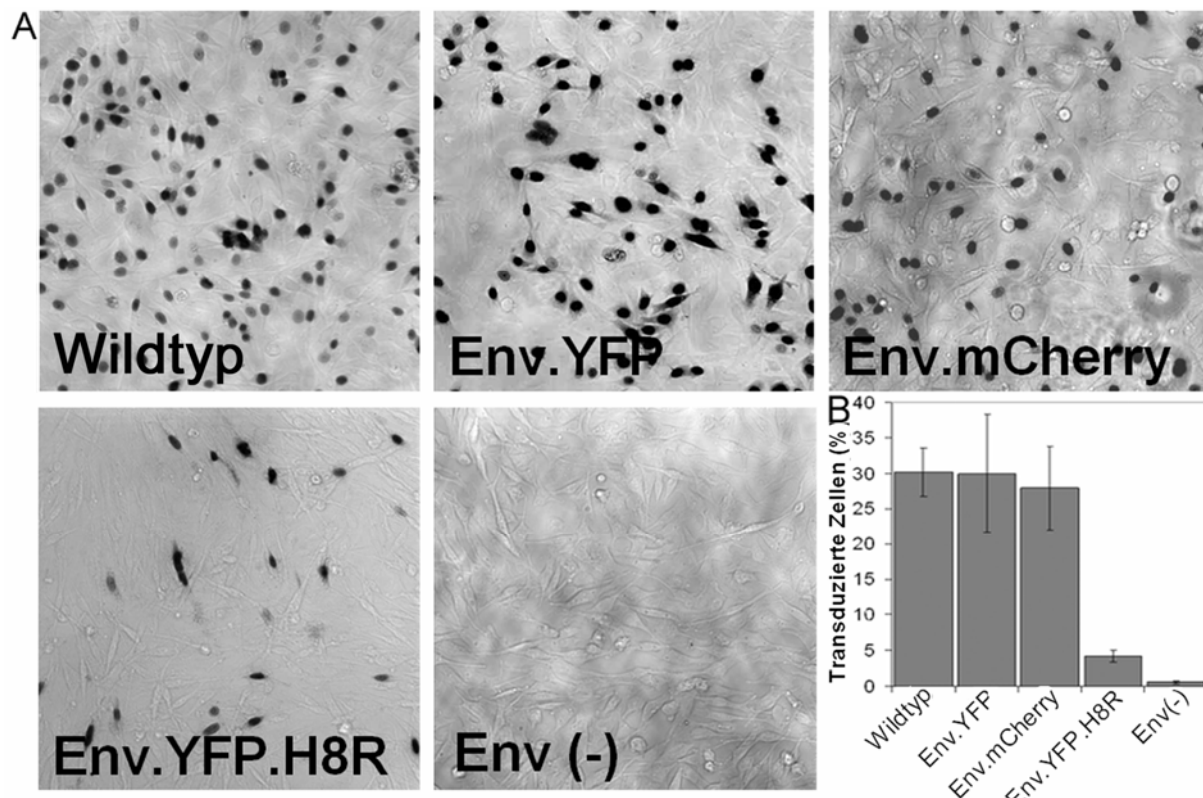


Abb. 3.10: Infektiösität von VLPs, die an Fibronectin gebunden waren

293T- Zellen wurden mit Plasmiden kodierend für MLV Gag-Pol, β -Galaktosidase Markergen und das angezeigte Hüllprotein transfiziert. MLV-Partikel wurden aus dem Überstand aufgereinigt. Vergleichbare Mengen an Partikeln wurden an fibronectinbeschichtete Deckgläser gebunden. DFJ-8 Zellen wurden durch Behandlung mit Trypsin in Suspension gebracht und zu den mit Partikeln beschichteten Deckgläsern gegeben. (A) Nach 48 h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen fixiert und β -Galaktosidase positive Zellen wurden gefärbt. (B) Je Ansatz wurde die Anzahl der infizierten Zellen aus 5 Sichtfeldern ausgezählt (entspricht etwa 500 Zellen). Die Graphik zeigt den Durchschnittswert und die Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten.

Diese verschiedenen Partikel wurden sodann auf Fibronectin gebunden und die Zellen auf diesen ausgesät. Nach 48 h wurden die Zellen mit X-Gal-Lösung gefärbt und die transduzierten Zellen gezählt. Es zeigte sich, dass Partikel mit Wildtyp MLV.Env in der Lage waren, ca. 30 % rezeptorpositive Zellen zu transduzieren (Abb. 3.10). Partikel mit dem MLV.Env.YFP-Protein waren ebenso potent, Zellen zu transduzieren wie der unmarkierte Wildtyp. Bei der Verwendung von Partikeln ohne Hüllproteine konnten vereinzelte transduzierte Zellen gefunden werden. Partikel, die im Hüllprotein die Punktmutation H8R trugen, waren zwar weiterhin in der Lage, Zellen zu transduzieren aber mit stark verminderter Effizienz. Die gleiche Menge Partikel transduzierte 5 % der Zellen im Vergleich zu 30 % für den Wildtyp. Die Transduktionseffizienz war also etwa 6mal geringer als die des Wildtyps (Abb. 3.10). Zum Ausschluss einer spezifischen Hemmung der Endozytose des Virus durch das Vorbinden der Viren auf Fibronectin, wurden *lac-z* positive MLV-Partikel mit den Hüllproteinen VSV-G bzw MLV.Env erzeugt und die Transduktionseffizienz des vorgelegten Virus in sich absetzenden Zellen mit dem von freien Viren auf adhärente Zellen verglichen. Um die tatsächlich an die Fibronectinoberfläche gebundene Menge an Viren zu bestimmen, wurde sowohl die RT-Aktivität der eingesetzten Viren als auch die nach dem Binden im Überstand verbliebene RT-Aktivität bestimmt. Die jeweils erzielte Anzahl an transduzierten Zellen wurde gegen die RT-Aktivität aufgetragen (Abb. 3.11). Insgesamt war in diesen Versuchen die Transduktionseffizienz geringer als im vorherigen Experiment (5 %). Die Menge an eingesetzten ungebundenen Viren verschiedener Verdünnung zeigt einen linearen Zusammenhang zu der Menge transduzierter Zellen. Die Menge vorgebundener Viren entsprach etwa 30 % der eingesetzten Menge. Damit wurde eine etwas höhere Anzahl β -Galaktosidase-positiver Zellen erzielt als mit den freien Partikeln. Im Fall des MLV.Envs ergab sich also ein leichter, allerdings nicht signifikanter Vorteil des gebundenen Virus gegenüber dem ungebundenen Virus.

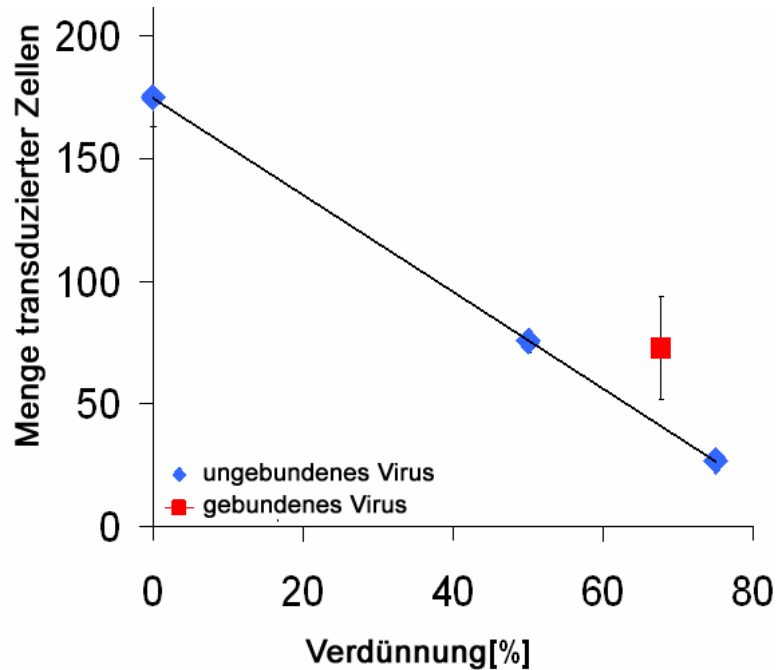


Abb. 3.11: Transduktionseffizienz von ungebundenen und vorgebundenen Viruspartikeln: Vektoren mit β -Galaktosidase-Reportergen wurden an Fibronektin gebunden, ungebundene Viren mit Überstand entfernt und die RT-Aktivität im Überstand bestimmt. Auf gebundenen Partikeln wurden Zellen ausgesät und nach 48h β -Galaktosidase-positive Zellen mit X-Gal gefärbt und gezählt. Die Transduktionseffizienz wurde mit einer Verdünnungsreihe ungebundener Vektoren verglichen.

3.5 Eintrittseffizienz vorgebundener Viren

Nach dem Ergebnis aus Abschnitt 3.4 ist MLV.Env-Fusion an der Plasmamembran von der Bindung an Fibronektin nicht beeinflusst. Es ist jedoch vorstellbar, dass die Adhäsion von Viruspartikeln an eine Oberfläche das Endozytieren der Partikel behindert. Folglich könnte sich das Verhältnis von der Fusion an der Plasmamembran und der Endozytose von Viruspartikeln ändern. Um dies genauer zu untersuchen, wurden Versuche zur Eintrittseffizienz von Partikeln mit verschiedenen Hüllproteinen parallel durchgeführt. Konkret wurde die Eintrittseffizienz gebundener und freier β -Lactamase enthaltene Partikel miteinander verglichen. Es wurden MLV.Env pseudotypisierte HIV Partikel mit inkorporierter β -Lactamase erzeugt. Dazu wurde in der Transfektion das Plasmid Blam.Vpr eingesetzt, welches für ein Fusionsprotein aus β -Lactamase und des Vpr-Proteins codiert. Die hergestellte β -Lactamase wird durch Vpr in die Partikel aufgenommen. Deren enzymatische Aktivität kann später nach erfolgtem Eindringen des Virus in die

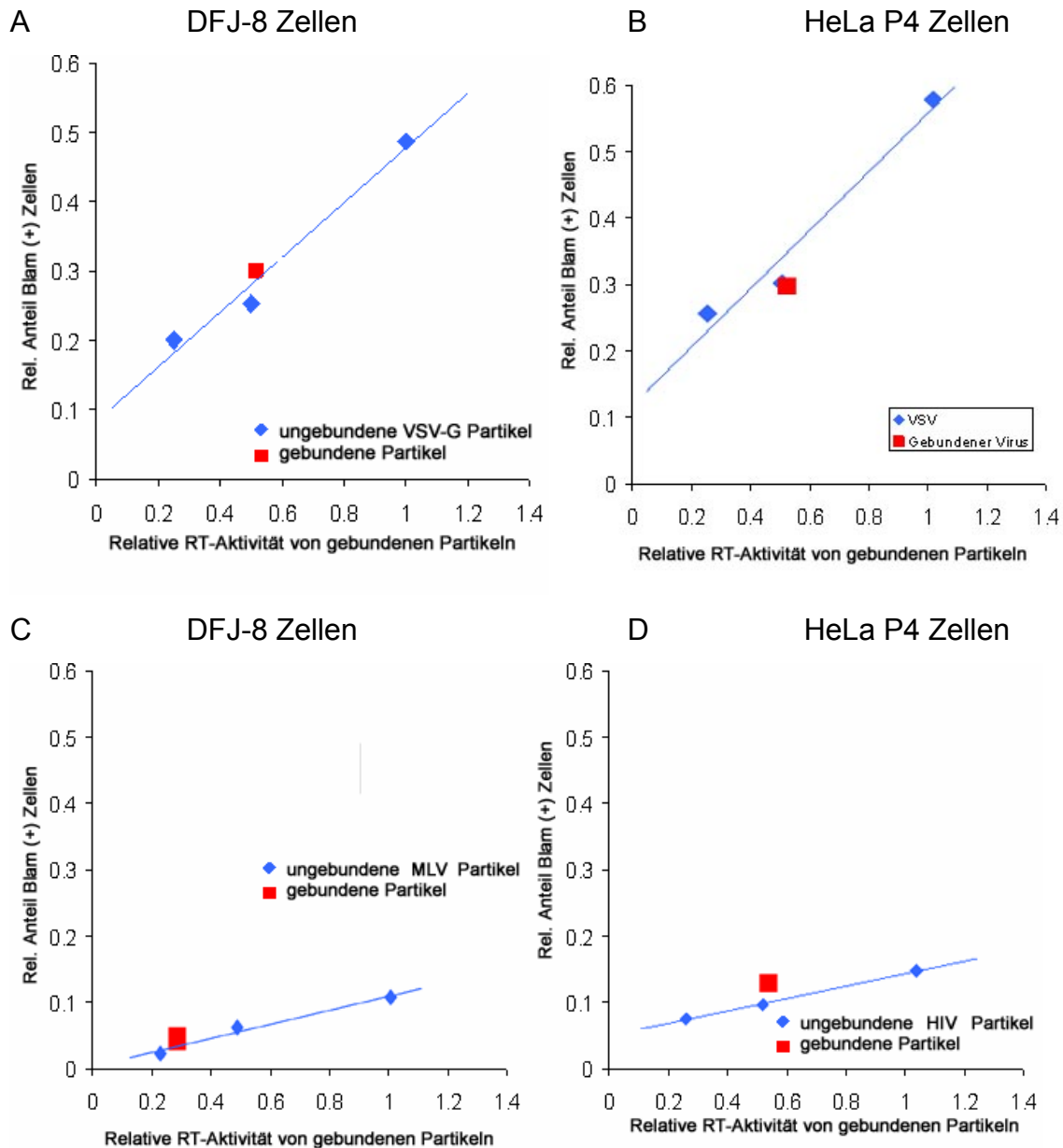


Abb.3.12: Vergleich der Eintrittseffizienz an Fibronektin gebundener und freier Partikel. Die Anzahl β -Lactamase positiver Zellen einer Verdünnungsreihe von ungebundenem Virus (blau) wurde mit gebundenem Virus (rot) verglichen. Die tatsächlich gebundene Virusmenge wurde durch ein RT-Assay bestimmt. Zur Differenzierung der Auswirkung des Vorbindens des Virus auf unterschiedliche Eindringwege wurden mit verschiedenen Hüllproteinen pseudotypisierte (jeweiliges Hüllprotein angezeigt), β -lactamasehaltige HIV-Partikel eingesetzt. (A) VSV-G pseudotypisierte Partikel mit DFJ-8 Zellen. (B) VSV-G pseudotypisierte HIV-Partikel mit HeLa P4 Zellen. (C) MLV.Env pseudotypisierte HIV-Partikel mit DFJ-8 Zellen. (D) HIV Partikel mit HeLa P4 Zellen.

Zielzelle mittels des Farbstoffs CCF2 nachgewiesen werden. Die eingesetzten HIV-Partikel trugen entweder kein Hüllprotein (Env(-)), oder HIV.Env, VSV-G oder MLV.Env. Die Partikel wurden auf Fibronectin gebunden und die RT-Aktivität bestimmt. Parallel wurde auch die Eintrittseffizienz von ungebundenen Partikeln auf ausgesäten Zellen gemessen. Die nach 6 h β -Lactamase positiven Zellen wurden bestimmt. Die RT-Aktivität wurde gegen die β -Lactamase-positiven Zellen aufgetragen. Es zeigte sich, dass von den eingesetzten Viren ein recht variabler Anteil von 10 % und 80 % an die Fibronectinoberfläche bindet. Je nach vorhandener RT-Aktivität lag der Prozentsatz an Lactamase-positiven Zellen zwischen 2 % und 60 %. Unabhängig vom verwendeten Hüllprotein ergab sich kein signifikanter Unterschied von vorgebundenen zu freien Viren (Abb.3.12).

3.6 Übertritt des viralen MLV.Env-Signals auf rezeptorpositive Zellen

Schon früher wurde beobachtet, dass während der Virus-Zell-Inkubation das Env.YFP Signal mit der Zeit auf die rezeptorpositiven Zellen übertragen wird ((Scherer, Lehmann et al. 2003)). Dieses Phänomen trat bei rezeptornegativen Zellen nicht auf. Daraus kann gefolgert werden, dass die Zellfärbung durch den Übertritt des Env.YFP in die Plasmamembran während der Fusion des Virus mit der Zielzelle hervorgerufen wird.

Um zu überprüfen, ob das Fluoreszenzsignal durch Fusion von Viren mit der Plasmamembran auf die Zellen übertragen wurde, wurden Viren mit YFP-markiertem MLV Hüllprotein, der mutierten Form des YFP-markiertem Hüllprotein H8R, und mit Partikeln, die eine inaktive Protease enthielten, verglichen. MLV.Env.YFP Partikel zeigten ein punktiertes Signal nach dem Beginn der Interaktion mit Zellen. Dies hatte sich nach 30 min in ein diffuses Plasmamembran-lokalisiertes Signal umgewandelt (Abb. 3.13). Beide fusionsbehinderten Virusvarianten zeigten im Vergleich zum Wildtyp einen deutlich verlangsamten Verlauf in der diffusen Färbung der Plasmamembran. Diese Differenz in der Zellfärbung war besonders ausgeprägt, wenn die Viren vorgebunden waren.

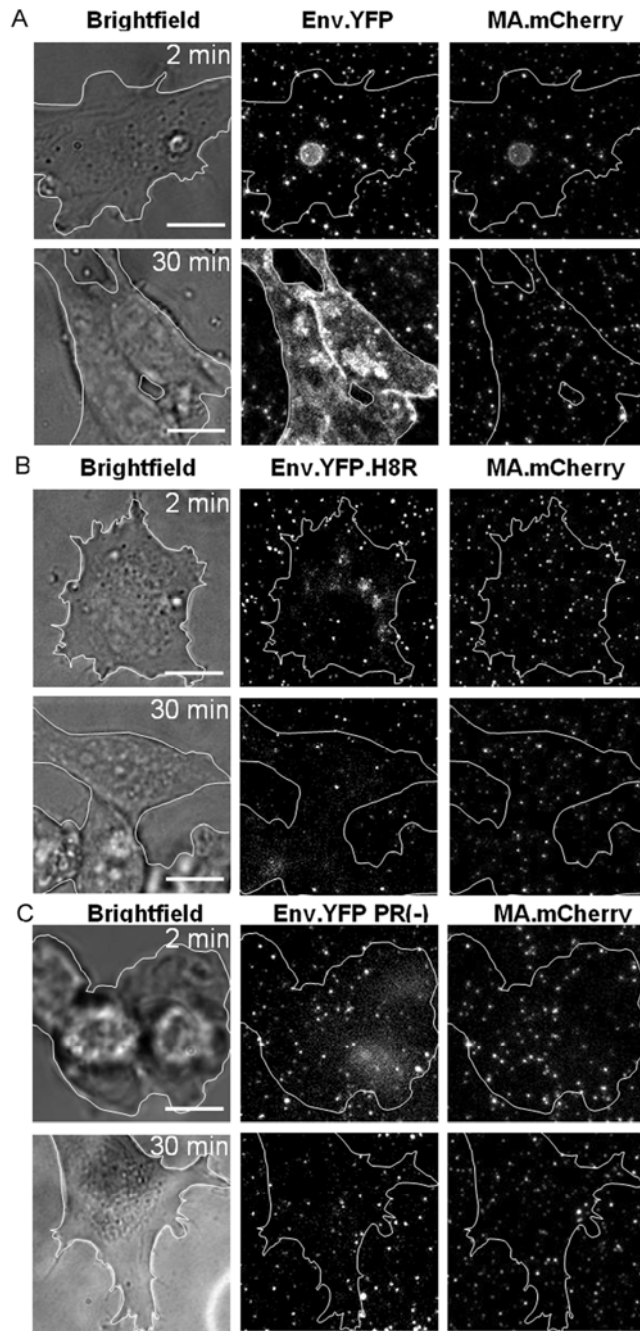


Abb. 3.13 Plasmamembranfärbung als Resultat der Virus-Zellinkubation mit fluoreszierenden Viren.

DFJ-8 Zellen wurden auf mit MLV.Env pseudotypisierten HIV-Partikeln (entsprechend 500 ng p24, markiert mit MA.mCherry mit den angezeigten Hüllproteinen) beschichteten Deckgläsern inkubiert: Partikel pseudotypisiert mit den MLV-Hüllprotein (A) Env.YFP; (B) punktmutiertes Env.YFP.H8R; (C) Env.YFP mit inaktiver Protease PR(-). Zellen wurden nach 2 und 30 min Virus-Zell-Kontakt fixiert und aufgenommen. Dargestellt sind die Maximumprojektionen der dekonvolvierten Z-Serien. Die weißen Linien indizieren die Umrisse der Zellen (bestimmt aus Hellfeldmikroskopie). Der Balken entspricht einer Länge von 10 μm.

In den Versuchen mit Wildtyp Hüllprotein wurde zunächst die Zellmembran gefärbt und begann erst nach 20 min, innere zelluläre Membranen zu erreichen. In allen Experimenten fiel auf, dass obwohl offensichtlich der Membranmarker fusionsabhängig auf die Zellen übertragen wurde, auch zu späten Zeitpunkten das MA-Signal weiterhin punktiert blieb. Auch die Zahl der punktierten MA-Signale schien sich nicht wesentlich geändert zu haben. Um diesen Umstand genauer zu untersuchen, wurden zusätzlich zur Signalübertragung der Env-Fluoreszenz auf die Plasmamembran nach Veränderungen in der Viruspopulation gesucht.

3.7 Verlust des Env.Signals auf Einzelpartikelebene

Um den Verlust der Hüllproteinsignale einzelner Partikel zu zeigen, wurden auf einer Fibronektinschicht wenige Partikel gebunden und darauf Zellen ausgesät. Mit dem Beginn des Absenkens der Zelle auf den Boden wurde die Aufnahme (mit einer Zeitauflösung von einem Bild pro Minute) der Fluoreszenzsignale der Viren gestartet (Abb. 3.14). Zu jedem Zeitpunkt wurde die Anzahl an punktierten Hüllproteinsignalen und MA.XFP-Signalen bestimmt und das Verhältnis aus Hüllproteinsignalen zu Matrixfluorophorsignalen gebildet. Zur Beurteilung, ob sich die Hüllproteine vor einem möglichen Auflösen der Matrix vom Partikel lösen, wurde die Anzahl der punktierten Env-Signale mit der Anzahl der MA.XFP-Signale verglichen. Dieser Quotient wurde zum Zeitpunkt Null normiert und gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 3.15).

Zum Ausschluss unspezifischer Signalverluste wie Bleichen des Fluorophors wurde auch der Quotient von Partikeln bestimmt, die während der Messung mit keiner Zelle in Kontakt kamen. Der Quotient dieser Partikel blieb über die Beobachtungszeit von 20 min konstant. Der Quotient der Wildtyp-Partikel mit Zellkontakt nahm über die Beobachtungszeit von 20 min kontinuierlich auf die Hälfte des Ausgangswertes ab. Damit ergab sich, dass etwa die Hälfte der Partikel während dieser Zeit mit der Zelle fusioniert hatten (Abb. 3.14 A, 3.15). Dieser Quotient wurde mit denen von Viren mit den H8R mutierten Hüllprotein und Protease negativen Partikel verglichen (Abb. 3.14 B, C). Beide Partikelarten zeigten einen deutlich geringeren Abfall des Env/MA-Quotienten als die Wildtyp-Partikel (Abb. 3.15). Um auszuschließen, dass der Verlust des Hüllproteinsignals durch z.B. Azidifikation eines Virus in einem Endosom verursacht wurde, wurde das Experiment in Gegenwart von Ammoniumchlorid wiederholt (Abb. 3.14 D). Zwar wirkte sich die Gegenwart von Ammoniumchlorid auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Zellen negativ aus, doch zeigten die Partikel mit Zellkontakt einen ähnlich raschen Verlust an Hüllproteinsignal wie zuvor.

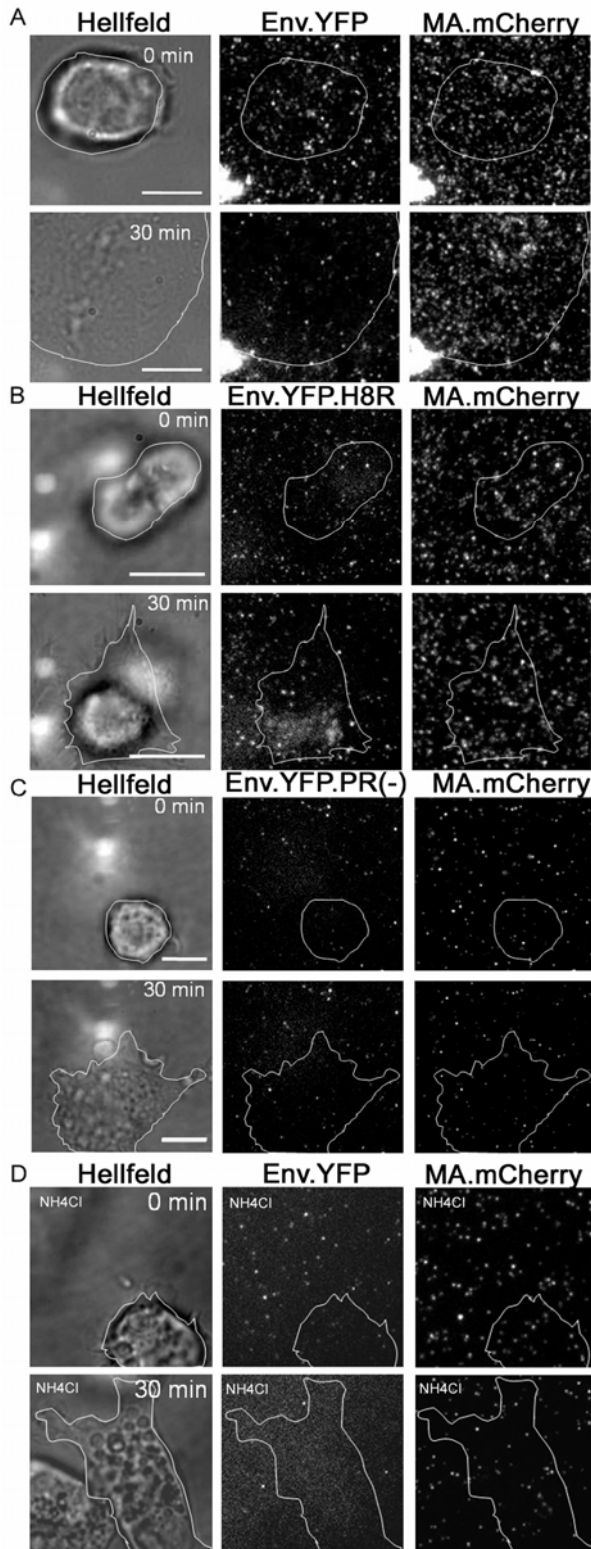


Abb. 3.14: Verlust des Env-Signals in der Partikelpopulation während des Virus-Zellkontakts.

Env.YFP und MA.mCherry markierte Viruspartikel wurden an Fibronektin beschichtete Deckgläser gebunden und unter "live cell imaging"-Bedingungen bei 37°C inkubiert. (Epifluoreszenz-Aufnahme). DFJ-8 Zellen wurden zugegeben und der Moment des Zellkontakts mit dem Deckglas als Zeitpunkt Null definiert. Die Virus-Zell-Interaktion wurde mit einem Bild pro Minute aufgenommen. Gezeigt ist die Fokusebene der angehefteten Viren. Bilder von Zellen auf einer Partikelschicht zu den Zeitpunkten 0 und 30 min. Umrisse der Zellen sind in den Bildern durch eine weiße Linie gekennzeichnet. Zu den jeweiligen Zeitpunkten ist die gleiche Zelle gezeigt, die sich während der Messung auf dem Deckglas ausgebreitet hat. (A) HIV-Partikel pseudotypisiert mit Env.YFP von MLV. Punktierte Env-Signale nehmen mit der Zeit ab, während die Zahl der MA-Signale fast konstant bleibt. (B) HIV-Partikel pseudotypisiert mit MLV-Hüllprotein Env.YFP.H8R. (C) Experiment mit dem Fusions-experiment mit Protease inaktiven Partikeln. Im Gegensatz zu fusogenen (A) zeigen die fusions-defizienten Partikel ((B) und (C)) keine Abnahme der Env-Signale. (D) Experiment, in dem die gleichen doppelt markierten Partikel wie in (A), aber in Gegenwart von 30 mM NH₄Cl, verwendet wurden. Env-Signale werden wie in (A) mit der Zeit weniger. Der Balken entspricht einer Länge von 10 μm.

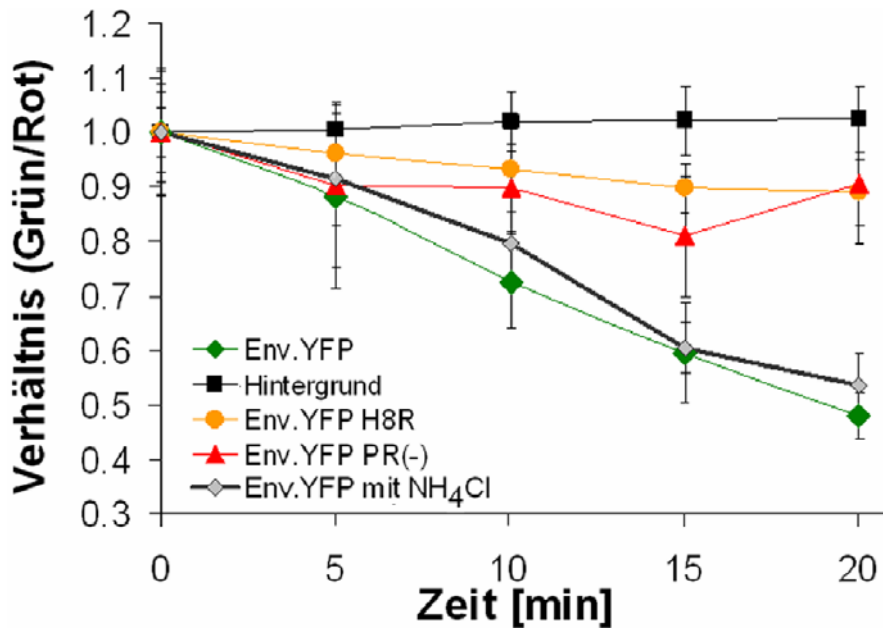


Abb. 3.15: Farbtrennung von doppelt markierten Partikeln während der Virus-Zellinkubation über die Zeit. Bilder wurden an den angegebenen Zeitpunkten aufgenommen. Die Anzahl der farbigen punktierten Strukturen wurde mit Hilfe des Programms ImageJ bestimmt. Die Anzahl an punktierten roten und grünen Signalen, herrührend von den MA.mCherry bzw. dem Env.YFP, wurden für mindestens 400 einzelne Partikel je Versuchsbedingung in drei unabhängigen Experimenten bestimmt und die Gesamtzahl der roten zu grünen Signale quantifiziert. Der Graph zeigt das Verhältnis von grünen zu roten Partikeln als Maß für die Anzahl doppelt markierter Partikel. Die Quantifizierung von Partikeln in Regionen mit Zellkontakt ist für Partikel mit dem Hüllprotein Env.YFP in Abwesenheit (grün) oder in Gegenwart (grau) von NH₄Cl, für Env.YFP.H8R (orange) und für Env.YFP.PR(-) (rot) gezeigt. Als Kontrolle wurde die gleiche Quantifizierung für Regionen ohne Zellen durchgeführt (schwarz).

3.8 Live cell imaging von Fusionsereignissen auf Einzelpartikel-ebene

Um die Fusion einzelner Partikel mit der Zellmembran zu verfolgen, wurde eine Trackingsoftware verwendet. Diese identifizierte zunächst einzelne Partikel anhand ihres Fluoreszenzintensitätsprofils. Dann wurden die einzelnen Partikel von Bild zu Bild über die gesamte Messung von der Software verfolgt. Identifiziert wurde ein Partikel im darauf folgenden Bild anhand der zuvor für dieses Partikel bestimmten Parameter, wie Intensität, Geschwindigkeit und Bewegungsrichtung. Für die Identifikation von Fusionsereignissen wurde besonders auf eine Änderung der

Relation der Intensitäten zwischen beiden Farbkanälen geachtet. Verlor ein Partikel in beiden Kanälen gleichzeitig das Signal, konnte nicht zwischen einer Fusion und raschem Wegtransport aus dem Beobachtungsraum unterschieden werden. blieb das Partikel aber über die restliche Messzeit (je nach Aufnahme von wenigen Sekunden bis zu zwei Minuten) in dem Kanal für den inneren Virusmarker sichtbar, so konnte Fusion angenommen werden. Die Beurteilung, ob eine Fusion stattgefunden hatte, beruhte zu einem großen Teil auf dem von der Software ausgegebenen Intensitätsprofil des Partikels über die Zeit, wurde aber auch immer per Auge beurteilt. Für den Befund der Farbtrennung wurden folgenden Kriterien angewendet:

1. Abfall der Signalintensität der Env-Markierung auf das Niveau des Hintergrundes.
2. Signal-zu-Rausch-Verhältnis in beiden Kanälen größer als 2 in den letzten Zeitpunkten vor der Fusion.
3. Mindestens 3 Bilder vor und nach einem Farbtrennungseignis sichtbar
4. Maximal 0,5 μm Entfernung zu der nächsten Zelle am Ende der Messung

Verliert ein Partikel in einem Kanal sein Signal in einer Zeit, die relativ kurz zur Aufnahmezeit ist, fällt die gemessene Intensität von einem relativ hohen Level auf ein tieferes ab. Daraus sollte sich ein Intensitätsverlauf ergeben, der sich am einfachsten mit einem sigmoiden Kurvenverlauf darstellen lassen könnte. Dies wurde zu einer einfachen Vorauswahl der gefunden Partikel ausgenutzt. Dazu wurden die drei Funktionen an die Intensitätsverläufe angenähert,

a) Linearer Verlauf:

$$y(t) = m \cdot t + c$$

b) Verlauf mit exponentiellem Abfall:

$$N(t) = N_0 \cdot e^{-\lambda \cdot t}$$

c) Verlauf mit sigmoidem Abfall:

$$y(t) = a \cdot e^{b \cdot e^{c \cdot t}}$$

Ließ sich der Intensitätsverlauf am besten durch die sigmoide Funktion darstellen und entsprach der Intensitätsunterschied mindestens einer Standardabweichung, lag ein mögliches Fusionsereignis vor. Mit Ausnahme von drei Fusionsereignissen ließen sich alle Fusionsereignisse am besten durch einen sigmoiden Kurvenverlauf beschreiben. In diesen drei Fällen lag die Fusion am Ende der Messung. Bei sorgfältiger Durchsicht von über 40.000 Partikeln, von denen sich wenigstens 20.000 Partikel unter oder wenigsten in der Nähe einer Zelle befanden, wurden 28 Farbtrennungsergebnisse gefunden, die Fusionsereignisse darstellten (zusammengefasst in Tabelle 3.3; Beispiel in Abb. 3.16 bzw. CD-Filme 5-7). Das früheste Fusionsereignis ereignete sich bereits nach 12 s Aufnahmezeit.

Außerdem wurden 45 Ereignisse detektiert, bei denen beide Farben gleichzeitig verschwanden. Diese könnten Fusionsereignisse darstellen, können aber nicht von sich ablösenden Partikeln unterschieden werden. In über 15.000 analysierten Partikeln, die in ihrer Fusionsfähigkeit eingeschränkt waren, konnte kein Fusionsereignis gefunden werden. Es fanden sich aber 12 Ereignisse mit gleichzeitigen Farbverlusten.

Die gefundenen Fusionsereignisse konnten nach ihren unterschiedlichen Bewegungsmustern eingeteilt werden. Es fanden sich 16 Ereignisse, bei denen keine erkennbare Partikelbewegung beobachtet wurde. 10 der korrespondierenden inneren Partikelsignale blieben während der gesamten Messung an der gleichen Stelle detektierbar. Die anderen 6 verschwanden während der Messung. Dabei kann nicht zwischen einer reinen z-Bewegung und z.B. einem Zerfall der MA-Hülle unterschieden werden. Dieser Verlust des MA.XFP-Signals wurde 3 bis 15 s nach dem Verschwinden des Env-Signals beobachtet.

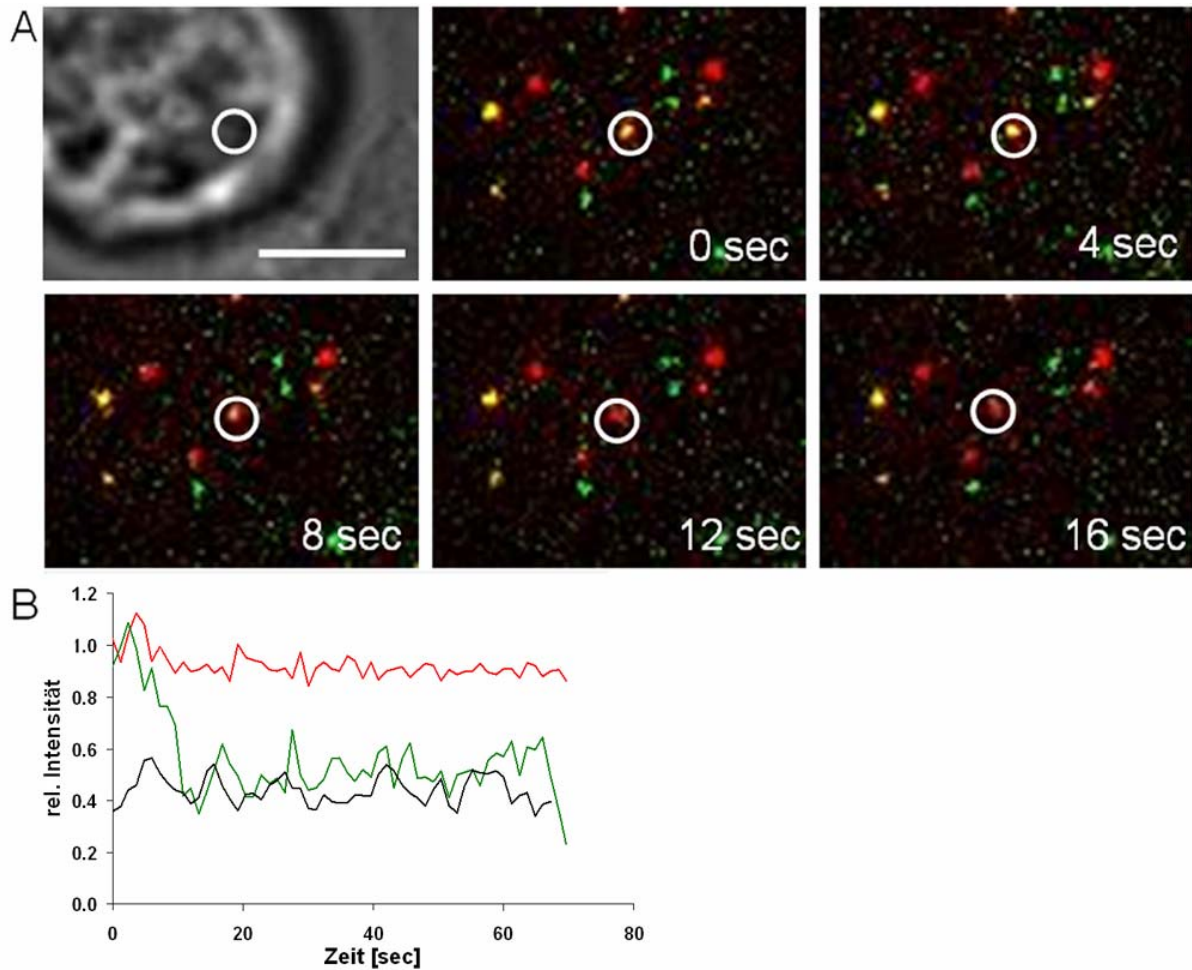


Abb. 3.16: Visualisierung der Fusion in Echtzeit. (A) MA.mCherry und Env.YFP doppelt markierte Partikel wurden auf Fibronektin beschichteten Deckgläsern immobilisiert und DFJ-8 Zellen wurden in den Überstand gegeben. Diese setzten sich auf der Virusschicht ab, was als Start der Virus-Zell-Interaktion definiert wurde (0 s). Die Aufnahme wurde im Moment der Adhäsion der Zelle an den Boden begonnen und erfolgte mit 0,76 Bildern/ Sekunde (~ 1 min nach Zellzugabe). Dargestellt sind einzelne Bilder einer solchen Aufnahme. Zeitpunkte sind angegeben als Zeit nach dem Aufnahmestart. Das relevante Partikel ist durch einen weißen Kreis gekennzeichnet. Skalierungsbalken = 10 μ m. Siehe auch CD-Filme 5-7 (B) Graph der gemessenen Partikel-Fluoreszenzintensitäten als Funktion der Zeit. Aufgetragen sind die normalisierten Intensitätswerte (siehe Text) des Env.YFP Signals (grün) und des MA.mCherry Signals des Viruspartikels aus (A) (durch weißen Kreis markiert) der Hintergrundintensität des Env.YFP Kanals (grau). Zeit der Virus-Zell-Interaktion ist in Sekunden angegeben.

Die 12 anderen waren durch Bewegung vor, nach oder sowohl nach und vor der Fusion gekennzeichnet. Die Bewegungen wurden nach ihrer Geschwindigkeit eingeteilt. Dabei wurden Geschwindigkeiten unter 50 nm/s vernachlässigt. Geschwindigkeiten zwischen 50-300 nm/s wurden als langsame Bewegung

angesehen und Geschwindigkeiten über 300 nm/sec als schnelle Bewegung. Mit diesen Kriterien ließen sich die 12 Fusionereignisse in vier Kategorien unterteilen. 7 waren stationär bis zu dem Moment der Fusion. Darauf gingen sie in eine gerichtete Bewegung über. Diese Bewegung wurde in drei Fällen als schnell in den anderen als langsam charakterisiert. In den anderen Fällen zeigten die Partikel schon vor der Fusion gerichtete Bewegung. Diese war in allen Fällen langsam. Nach der Fusion wurde die langsame Geschwindigkeit beibehalten (drei Fälle) oder es fand gerichtete schnelle Bewegung statt (zwei Fälle). In allen diesen sieben Fällen war die Fusion mit einer Änderung der Bewegungsrichtung assoziiert (Beispiele für Trajektorien Abb. 3.17).

Intensitätsprofile: Wie aus den Kriterien für die Fusion ersichtlich, waren alle Partikel in beiden Farben markiert, wobei das Signal-zu-Rausch-Verhältnis für beide Markierungen über zwei lag. Eine Fusion mit der Plasmamembran wurde dann angenommen, wenn die Intensität des Env-Signals auf die Intensität des Hintergrundes abfiel. Um den zeitlichen Verlauf dieses Signalabfalls zu bestimmen, wurden die von der Trackingsoftware berechneten Näherungskurven verwendet. Dabei galt das Ende des linearen Bereichs vor und nach der Fusion als Start- bzw. Endpunkt der Fusion. In den drei Fällen, in denen trotz stattgefundenem Fusionereignis kein sigmoider Verlauf angepasst wurde, wurden die Intensitätsprofile der letzten 10 Datenpunkte, die sicher vor bzw. nach der Fusion lagen, durch eine Gerade angenähert (die Annäherungsgerade nach der Fusion konnte nicht in allen Fällen durch 10 Punkte beschrieben werden, da die Messung in einem Fall schon nach 5 Datenpunkten endete). Die Dauer des Signalverlusts wurde als die Zeit angenommen, in der die gemessenen Intensitäten nicht mehr über bzw. unter dem Level der Geraden lagen. 25 der 28 Fusionereignisse zeigten einen schnellen Intensitätsverlust, der durchschnittlich 4,2 s dauerte (zwischen 2,4 s und 6,0 s). In drei Fällen war der Intensitätsverlust deutlich langsamer (10 s, 14 s, 15 s).

Tabelle 3.3 Auflistung aller Farbtrennungseignisse mit MA.XFP markierten MLV.Env pseudotypisierten Partikeln:

Datensatz	Zeit nach Zell-Kontakt [s]	Bewegungsmuster	Intensitätsabfall [s]	Beobachtungszeit nach Fusion [s]	MA-Abfall
080328-MLV8-3	67.5	-/-	10.5	12	Ja-direkt im Anschluß
080328-MLV8-3	49.5	-/-	3	3	Ja-direkt im Anschluß
080312-MLV7-3	120	55-135-/- 435	9	31	Ja
080312-MLV7-3	56	-/-	7	5	Ja
080328-MLV8-3	63	0-60-/-0	4.5	3	Ja
080525-DFJ8-11 238	54	0-110/-125	3	22.5	nein
080525-DFJ8-11 162	30	-/-	15	105	Nein
080525-DFJ8-11 235	55.5	-/150	6	6	Ja
080525-DFJ8-11 242	112.5	-/-	10.5	27	Nein
080525-DFJ8-4	36	-/-	15	10.5	Ja
080312-MLV-MaC-2	12.5	0-150-/-210	6	120	Nein
080312-MLV-MaC-2	102	- /-150	3.5	6	Ja
080312-MLV-MaC-2	67.5	-/-	3.5	89	Ja
080904-MLV-YFP2	100.5	-/-	6	15	Ja
080904-MLV-YFP2	64.5	-/-	6	18	Ja

Ergebnisse

Datensatz	Zeit nach Zell-Kontakt [s]	Bewegungsmuster	Intensitätsabfall [s]	Beobachtungszeit nach Fusion [s]	MA-Abfall
080904-MLV-YFP2	43.5	-/-140	4.5	21.5	Nein
080904-MLV-YFP2	130.5	100-/-120	3	9	Ja
080806-MLV-YFP	28.5	-/-	3	30	Nein
080806-MLV-YFP	55.5	-/-350	10.5	15	Ja
080625-MLVmCherry-1-1	57	-/-	9	24	Ja
080602-MLV-YFP	82.5	-/-	4.5	25.5	Ja
080728-DFJ8-4	118.5	-/-	4.5	21.5	Ja
080806-MLV-YFP	34.5	-/-450	9	10.5	Ja
080702-D8	46.5	-/-	6	97.5	Ja
080702-D8	39	-/-	12	99	Ja
080526-DFJ-8	60	-/-600	13.5	7.5	Ja
080905-MLV-2	67.5	110-/-400	3	10.5	Ja
090105-MLV	109.5	-/-	4.5	36	Ja

Tabelle fasst die Farbtrennungsergebnisse der MA.mCherry markierten Pseudotypen zusammen. Zeit nach Kontakt beschreibt die Zeit nach Start der Messung, also die ungefähre Zeit nach Absinken der Zelle auf das Deckglas. Bewegungsmuster gibt die Geschwindigkeit vor (x / -) und nach (- / x) der Fusion (/) in nm/sec an. Intensitätsabfall gibt die Dauer des Intensitätsabfalls bis zum Hintergrundlevel an. Beobachtungszeit nach Fusion meint die Zeit die das Partikel nach dem Farbtrennungsergebnis noch detektierbar bleibt. MA-Abfall beurteilt, ob die Intensität des MA.mCherry-Signals nach der Fusion unter die Hälfte des Ursprungswertes fiel.

3.9 MA-Signale nach der Fusion

Bei Farbtrennungseignissen blieb das MA.XFP-Signal länger als punktierte Struktur sichtbar als das Hüllprotein. Nach der bisherigen Vorstellung sollte das MA.XFP-Signal mit den Matrixproteinen während oder kurz nach der Fusion vom Rest der inneren Partikelbestandteile verloren gehen. Daher wurde das Intensitätsprofil des MA.XFP-Signals nach der Fusion genauer betrachtet. Nach Verlust des Env.XFP-Signals sank in 6 Fällen der 16 sich nicht bewegenden Partikel das MA.XFP-Signal ebenfalls auf Hintergrundniveau ab. Dies könnte eine Bewegung in z ohne erkennbare Bewegung in der X-Y-Ebene darstellen oder von einer Auflösung der MA im Zytosol der Zelle bedingt sein. Von den restlichen 10 bewegungslosen Ereignissen fiel in 7 Fällen auch das MA.XFP-Signal während des Env-Signalverlusts merklich ab, blieb aber detektierbar. Wahrscheinlich stammt dies von einer teilweisen Ablösung der MA im Zytosol. Vermutlich bleibt nur ein sehr geringer Teil der MA-Proteine bis zu späten Zeitpunkten des Eintrittsprozesses mit dem Virusgenom assoziiert. Der detektierte Signalverlust in diesen 7 Fällen entspricht nicht der erwarteten Größe. Vielmehr passen zu dieser Vorstellung die 6 Ereignisse mit komplettem MA.XFP-Signalverlust nach der Farbtrennung.

Auch in den bewegungsassoziierten Fusionsereignissen verschwanden 8 der 12 MA.XFP Signale während der Messung. In den anderen 4 Fällen waren in zwei Fällen keine Intensitätsverlustsignale zu verzeichnen. Die anderen zwei zeigten einen geringen Intensitätsverlust im MA.XFP-Signal während oder kurz nach dem Env-Signalverlust, blieben aber weiterhin detektierbar.

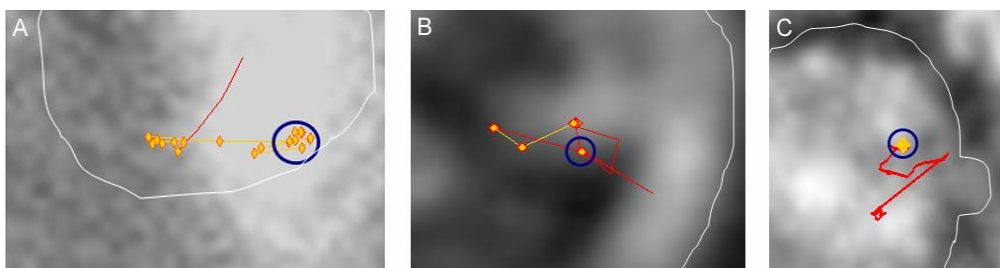


Abb. 3.17: Beispieltrajektorien von einzelnen Partikeln, die ein Farbtrennungseignis zeigen. (A-C) Trajektorien von einzelnen Partikeln aus *live cell imaging* Experimenten. Experimentelle Bedingungen waren für alle dargestellten Ereignisse gleich. Die weißen Linien bezeichnen die Umrisse der Zelle (bestimmt aus den Hellfeldaufnahmen). Der blaue Kreis zeigt die Anfangsposition des Partikels. Zur Darstellung der Fusion wird die doppelt markierte Phase des Partikels durch eine gelbe Linie dargestellt, während die Phase nach der Fusion in rot gezeigt wird. Balken = 5 μm .

3.10 Verhalten anderer viraler Strukturen nach der Fusion

Die Beobachtungen in Abschnitt 3.9 deuten darauf hin, dass die MA nach der Fusion sich nicht sofort im Zytosol auflöst. Um die Frage einer zumindest vorübergehend stabilen MA-Struktur assoziiert mit dem Viruskapsid nach der Fusion zu beantworten, bedarf es eines zusätzlichen Virusmarkers, der möglichst mit dem Viruskern assoziiert bleibt. Zur Etablierung eines solchen Markers wurde die MA.XFP-Markierung durch eine Markierung des Vpr-Proteins bzw. der Integrase ersetzt. Die Partikel wurden wie zuvor durch Transfektion gewonnen und mit Hilfe von Fibronectin auf dem Deckglas immobilisiert. Nach Zugabe von DFJ-8 Zellen wurde die Aufnahme der Partikel mit Zellkontakt am Mikroskop gestartet. Die Ergebnisse wurden mit den zuvor in Abschnitt 3.7 erhobenen Daten verglichen (Ergebnisse für mCherry.Vpr markierte Partikel in Abb. 3.18 zusammengefasst).

Änderung der Virusfluoreszenzsignale während der Virus-Zellinteraktion: Wie schon bei den MA.XFP-markierten Partikeln wurden die Partikel während des Ausbreitens einer Zelle auf dem Deckglas mit einem Bild pro Minute aufgenommen und auf ihre Doppeltmarkierung hin untersucht. Dazu wurde der Quotient aus Env-Signal zu Vpr- bzw. IN-Signal gebildet, auf den Zeitpunkt Null normiert und gegen die Zeit aufgetragen. Für beide Virusvarianten ergab sich ein Abfall dieses Quotienten innerhalb der ersten 20 min von 1 auf 0,5. Der gesamte Kurvenverlauf war dem der MA.XFP-markierten Partikel ähnlich. Zur Visualisierung wurden die Daten der mCherry.Vpr-Messungen mit einem Teil der Daten aus Abbildung 3.15 in einem Diagramm dargestellt (Abb. 3.18).

Fusion einzelner Partikel: Die Analyse der Partikel erfolgte wieder mit Hilfe der Trackingsoftware und den oben angeführten Fusionskriterien. Insgesamt wurden im Falle der Vpr-markierten Partikel 3.523 Partikel in Zellnähe (siehe 3.8) untersucht und fünf Farbtrennungseignisse gefunden. Im Falle der fluoreszenzmarkierten IN.eGFP lag die analysierte Anzahl von Partikeln bei 1.570, darunter wurden drei Farbtrennungseignisse detektiert. Trackingergebnisse wurden in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

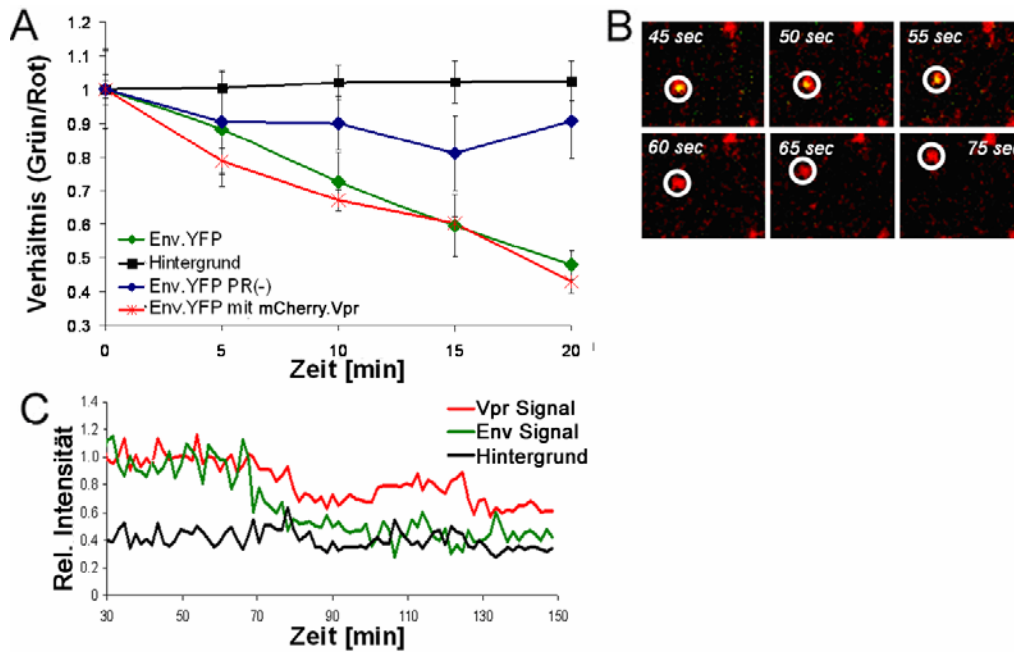


Abb. 3.18: Verhalten von mCherry.Vpr markierten Partikeln: A) Farbtrennungseignisse von zweifach markierten Partikel über die Zeit. Env.YFP pseudotypisierte HIV-Partikel mit inkorporiertem mCherry.Vpr wurden an Fibronectin beschichtete Deckgläser gebunden und unter “*live cell imaging*”-Bedingungen bei 37°C inkubiert. (Epifluoreszenz-Aufnahme). DFJ-8 Zellen wurden zugegeben, und der Moment des Zellkontakts mit dem Deckglas wurde als Zeitpunkt Null definiert. Die Virus-Zell-Interaktion wurde mit einem Bild pro Minute aufgenommen. Zum Vergleich der mCherry.Vpr- (rot) mit der MA.XFP-Markierung wurde neben den mCherry.Vpr Daten, ein Teil der Daten aus Abb. 3.15 mit dargestellt (Env.YFP und MA.mCherry markierte Partikel mit (grün) oder ohne (blau) aktiver Protease, Partikel ohne Zellkontakt (schwarz)). Bildaufnahmen entsprechen den angegebenen Zeitpunkten nach Zell-Viruskontakt und wurden mit Hilfe des Programms ImageJ ausgezählt. Dargestellt ist das Verhältnis der grünen zu roten Signale, die Env.YFP bzw. MA.mCherry entsprechen. Jeder dargestellte Datensatz entspricht mindestens 400 Partikeln aus drei unabhängigen Experimenten. In Regionen mit sich absetzenden Zellen wurden Partikel, die mit Env.YFP und MA.mCherry (grün) oder mCherry.Vpr (rot) markiert waren, quantifiziert. Als Kontrollen dienten PR-defiziente Partikel (blau) und Partikel ohne Zellkontakt (schwarz). (B) mCherry.Vpr und Env.YFP doppelt markierte Partikel wurden auf einem fibronectinbeschichteten Deckglas immobilisiert und DFJ-8 Zellen darüber ausgesät. Die Aufnahme erfolgte mit einer Frequenz von 0.76 Bildern/ Sekunde und wurde mit dem Beginn der Adhäsion der Zelle an das Deckglas begonnen. Das relevante Partikel ist durch einen weißen Kreis gekennzeichnet. Siehe auch CD-Filme 8-10. (C) Graphen stellen die Fluoreszenzintensitäten des Partikels über die Zeit dar. Dargestellt sind die normalisierten Intensitäten des mCherry.Vpr Signals (rot), des Env.YFP Signals (grün) und der Hintergrund des YFP Kanals (grau). Die angegebene Zeit entspricht der Zeit nach dem Start der Aufnahme.

Alle gefundenen Fusionsereignisse mit fluoreszenzmarkierten XFP.Vpr und IN.eGFP waren bewegungsassoziiert. Dabei trat bei 4 Fusionen bereits vor der Fusion langsame Bewegung auf. In einem Fall (Vpr-markiert) war weder eine Änderung der Richtung, noch eine Änderung der Geschwindigkeit festzustellen. In den anderen Fällen blieb die Bewegung zwar langsam, zeigte aber eine Änderung in der Bewegungsrichtung mit dem Zeitpunkt der Farbtrennung. Der Verlust des Env-Signals war in allen Fällen zwischen den bei der MA gefundenen Grenzen (2,4 s bis 6,0 s).

Tabelle 3.4: Zusammenfassung der Trackingergebnisse mit unterschiedlichen Partikeln.

MLV.Env.XFP	H8R	Wt	Wt	Wt	Wt
Innerer Marker	MA	MA	MA	Vpr	IN
Protease	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
Tracks (total)	11609	1898	21054	3523	1570
Farb-trennungen	0	28	0	5	3

3.11 Hüllprotein der fusionierenden Partikel

Die Überlegung liegt nahe, dass Partikel mit hoher Hüllproteinkonzentration eher fusionieren sollten als Partikel mit wenig Hüllprotein. Da in diesen Experimenten das Hüllprotein fluoreszenzmarkiert ist, sollte die Intensität des Env.XFP Signals eines Partikels mit der Menge Hüllprotein auf diesen Partikeln korrelieren. Um zu analysieren, wie sich Partikel mit hoher Hüllproteinmenge gegenüber Partikeln mit wenig Hüllprotein verhielten, wurden die Daten der Abb. 3.14 und 3.15 (Abschnitt 3.8) mit der Trackingsoftware analysiert. Von 100 erkannten Viren wurden die Intensitäten des Env-Signals zum ersten Zeitpunkt der Detektion herangezogen. Diese wurden in stark markierte (alle Partikel heller als 2/3 der maximal gemessenen Intensität), mittel stark markierte (alle Partikel mit im mittleren Drittel der gemessenen

maximalen Intensitäten) und geringer Env-Intensität (Partikel mit geringerer Intensität als 1/3 der maximal gemessenen Intensität) eingeteilt. Diese wurden gegen die Zeit, die das Signal beobachtbar war, aufgetragen (Abb. 3.19). Es zeigte sich, dass die Partikel mittlerer Intensität am kürzesten beobachtbar waren. Bei Partikeln mit geringer Markierung war ein langsamerer, aber stetiger Verlust des Env-Signals zu beobachten. Sehr helle Partikel erwiesen sich als lange detektierbar. Da es sich um die hellsten Partikel handelt, legt allerdings nahe, dass es sich hierbei um Aggregate und nicht um einzelne Partikel handeln könnte.

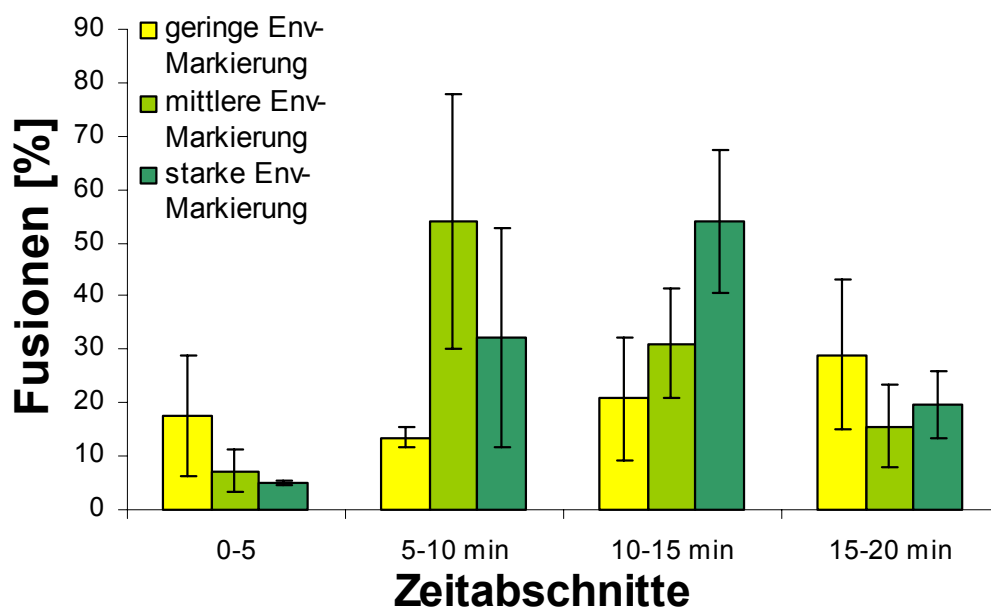


Abb. 3.19: Abhängigkeit des Fusionszeitpunktes mit der Menge Hüllprotein der MLV.Env pseudotypisierten HIV Partikeln. Hierfür wurde ein Teil der Daten aus Abschnitt 3.7 ausgewertet. Partikel unter Zellen (289 Partikel, 3 Experimente, 4 Zellen), die Fusion untergingen (Verlust des Env-Signals), wurden ihrem Env-Signal entsprechend sortiert. Mit Hilfe von ImageJ wurde festgestellt in welchem Zeitabschnitt der Messung die Partikel ihr Env-Signal verloren. Die Anzahl der Fusionsereignisse in den entsprechenden Populationen (Y-Achse) wurde gegen die Zeit aufgetragen (X-Achse).

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, Fusionsereignisse einzelner Viren mit Zellen in Echtzeit zu detektieren und zu charakterisieren. Bisher wurden die Eigenschaften der Virusfusion mittels biochemischer Experimente en gros oder durch Zell-Zell-Fusionsexperimente analysiert. Im letzteren Fall wurde der Rezeptor des Virus in der einen und das zur Fusion nötige Hüllprotein des Virus in einer anderen Zelle exprimiert sowie die Fusion beider Zellen miteinander charakterisiert. Ein solches System unterscheidet sich in der Konzentration an Hüllproteinen sowie in den geometrischen Eigenschaften, wie Kontaktfläche und Membrankrümmung der Zell-Zell-Fusion, deutlich von denen der Virus-Zell-Fusion ((Gallo, Finnegan et al. 2003)). Ein HI-Virus besitzt einen durchschnittlichen Durchmesser von 140 nm und ist annähernd rund. Verglichen damit ist eine Zelle sehr groß (z.B. HeLa-Zellen ~15 µm ((Deman, Vakaet et al. 1976))), die Plasmamembran kann im Verhältnis zum Virus als Ebene betrachtet werden. Die Untersuchung mit HIV-Proteinen in den Zell-Zell-Fusionsexperimenten ermittelte eine durchschnittliche Fusions-Halbwertszeit von 10-30 min. In dieser Arbeit wurden für fluoreszenzmarkierte Viren 28 Fusionsereignisse beschrieben, die in den frühesten Fällen bereits wenige Sekunden nach der Virus-Zellinteraktion auftraten. Dazu waren zuerst neue Markierungsstrategien für die Virusmembran auf ihre Eignung als Fusionsindikator getestet worden.

4.1 Etablierung einer Membranfärbung

Erste Voraussetzung für die Detektion von retroviralen Fusionsereignissen auf Einzelpartikelebene war die Etablierung eines viralen Membranmarkers. Dieser sollte sich durch die Virus-Zell-Fusion in der Zellmembran verdünnen und nicht mehr mit dem Viruskern kolokalisieren. Dazu musste die Markierung für das Mikroskopieren unter *live cell imaging* Bedingungen hell genug sein ohne die Eindringkompetenz des Virus zu verändern.

4.1.1 Membranfärbung über fluoreszenzmarkierte Lipide

Zu diesem Zweck wurde als erstes versucht, mit fluoreszenzmarkierten Lipiden die Virusmembran zu markieren. Aufgrund einer Studie, in der fluoreszierende Lipide mit Gag kolokalisierten und sich auch in freien Partikeln als Fluoreszenzmarkierung finden ließen ((Booth, Fang et al. 2006)), lag es nahe, diese Experimente zu reproduzieren und nach eventuell potenteren fluoreszenzmarkierten Lipiden für die Partikelmarkierung zu suchen. Da bekannt war, dass sich die Lipidmembran des Virus von der Plasmamembran der partikelproduzierenden Zelle durch einen besonders hohen Gehalt an raftbildenden Lipiden wie Cholesterol und Sphingosinen unterscheidet, wurden Lipide gewählt, die sich ebenfalls in dieser Lipidfraktion anreichern ((Brügger, Glass et al. 2005)).

Schon bei der Inkubation der Zellen mit den fluoreszenzmarkierten Lipiden zeigte sich jedoch, dass die veränderten Lipide sich anders verhielten als ihre unmarkierten Derivate. So befand sich das markierte GM1 nach 10 min noch hauptsächlich an der Plasmamembran. Nach einer Stunde akkumulierte die GM1-Bodipy Fluoreszenz fast ausschließlich im Golgi-Apparat (unmarkiertes GM1 befindet sich hauptsächlich in der Plasmamembran). Es ist bekannt, dass sich fluoreszenzmarkierte Lipide anders verhalten als ihre unmarkierten Derivate ((London 2002)). Besonders stark können sich schon kleine Modifikationen innerhalb der Acylkette auf die intrazelluläre Verteilung auswirken ((van Meer, Voelker et al. 2008)). Die Acylkettenlänge beeinflusst beispielsweise die Verteilung eines Lipids in cholesterinreichen, rigiden und fluiden Membranbereichen. Änderungen in der Struktur der Acylkette oder Verlängerungen der Acylkette (auch durch kleine Fluorophore wie NBD) führen zu einer veränderten Verteilung der markierten Lipide innerhalb der Zellmembranen ((Benting, Rietveld et al. 1999); (London 2002)). Diese Veränderung der Lokalisation (die Veränderung der Lokalisation von der Plasmamembran zum Golgi-Apparat) fand sich in den Versuchen wieder. Dies ist als Hauptursache für die geringe Inkorporation der markierten Lipidvarianten in die Virusmembran zu sehen.

Auch die in der Literatur beschriebene Markierung der Assemblierungsorte naszierender Viren und freier Viren mit PE-TMR in Sup-T1-Zellen ((Booth, Fang et al. 2006)) ließen sich nur bedingt reproduzieren. Während der Inkubation von virusproduzierenden Zellen mit diesem Lipid zeigte sich zwar in einigen Fällen die berichtete Kolokalisation von Lipiden mit dem Ort der Gag-Assemblierung (30 % aller

beobachteten Zellen zeigten eine Kolokalisation), doch die Ausbeute an freien Partikeln mit einem suffizienten Membransignal aus den Zellüberständen war zu gering für den Einsatz in Viruseintrittsexperimenten. Eine Übertragung der Versuchsbedingungen auf HeLa-Zellen, die eine größere Ausbeute an Viren liefern sollten, schlug fehl, da sich die Kolokalisation von Virusassemblierung und markiertem Lipid in diesem Zelltyp nicht beobachten ließ.

Der Versuch, bereits aufgereinigte Partikel direkt mit Lipiden zu markieren, führte ebenfalls zu keiner zufriedenstellenden Markierung. Die Strategie, Partikel direkt zu markieren, wurde mit lipophilen Fluoreszenzfarbstoffen schon erfolgreich getestet (wie z.B. DiD, (Melikyan, Barnard et al. 2005), oder PE-Fluoreszeinderivate (Stephan Urban, direkte Kommunikation)). Das einzige der neu ausgewählten Lipide mit zufriedenstellender Markierungseffizienz stellte das GM1 dar. Diese Markierung erwies sich jedoch als unspezifisch, da der Übertritt des Farbstoffs nahezu ungehindert von den Partikeln in die Membran der Zelle auch schon bei unspezifischer Virus-Zellinteraktion erfolgte. Ursache könnte sein, dass das Lipid nur an der Oberfläche der Partikel adsorbierte oder nur unzureichend in die Membran integrierte. Dies wurde schon für Lipide berichtet, die – wie dieses – ihre Markierung in einer Acylkette tragen. Die markierte Acylkette integriert dabei nicht vollständig in die Membran ((Shaw, Epand et al. 2006)). Der Fluorophor wird an der Oberfläche der Lipidmembran belassen. Es ist vorstellbar, dass solche Lipide leichter von einer in eine benachbarte Membran wechseln können.

4.1.2 Membranfärbung mittels fluoreszenzmarkierten Proteinen

Ein weiterer Versuch die Membran eines Virus mit einer Fluoreszenzmarkierung zu versehen, war die Verwendung von Proteinmembranankern gekoppelt an einen fluoreszierenden Farbstoff. Als erstes wurde ein GPI- Anker, der an eGFP gekoppelt ist, getestet. Dieses Vorgehen beruht auf einer Publikation über den Versuch Fusionen von HI-Viren zu visualisieren ((Campbell, Perez et al. 2007)). Das jeweilige für das fluoreszenzmarkierte Ankerprotein kodierende Plasmid wurde zusammen mit den Plasmiden für die Produktion MA-markierter Partikel in 293T-Zellen kotransfiziert und die aufgereinigten Partikel mittels Mikroskopie auf ihre Fluoreszenzeigenschaften hin beurteilt. Insgesamt war die erreichte Intensität der Markierung gering und nur mit hohen Belichtungszeiten waren Viruspartikel gegen einen

zellulären Hintergrund abzugrenzen. Insbesondere in Langzeitexperimenten über mehrere Minuten bleichte die Markierung durch die starke Belichtung schnell aus. Es wurde daher versucht, mittels des SNAP-Tag Systems lichtintensivere und bleichresistentere organische Fluorophore, wie z.B. ATTO647N, an die Proteinanker zu koppeln. Da der GPI-Anker sich als effektiv in den Versuchen mit fluoreszierenden Proteinen erwiesen hatte, wurde ein SNAP-Tag, gekoppelt an einen GPI-Anker, für die Markierung gewählt. In Abhängigkeit von der transfizierten Plasmidmenge wurde das GPI.SNAP in zunehmendem Maße in die Partikel inkorporiert. Nach Inkubation mit dem an das SNAP-Substrat gekoppelten Fluorophor waren die markierten Partikel ausreichend signalintensiv, um mit ihnen *live cell* Mikroskopie zu betreiben. Zwar verschlechterte eine sehr hohe Expression an GPI.SNAP die Eintrittskompetenz der Viren, die Verwendung der Partikel mit etwas geringerer SNAP-Inkorporation stellte aber einen akzeptablen Kompromiss zwischen Helligkeit und Eintrittskompetenz dar. Grund für die Verringerung der Eintrittskompetenz ist vermutlich die Zytotoxizität von GPI ((Campbell, Perez et al. 2007)). Stress in virusproduzierenden Zellen führt zu einer Freisetzung von nicht partikelassoziiertem Gag in den Überstand und so zu einer Verfälschung der Bestimmung der Partikelkonzentration. In der Folge wurden die MA-XFP und GPI.SNAP doppelt markierten Partikel mit Zellen inkubiert und erfolgreich mit der automatischen Trackingsoftware analysiert. Bis jetzt wurde mit diesem System allerdings keine Farbtrennung als Korrelat für die Fusion detektiert. Die Markierung über das SNAP-System führte also zu einer befriedigenden Membranfärbung. Trotzdem konnten bis jetzt keine Fusionsereignisse nachgewiesen werden, vermutlich aufgrund der relativ geringen Fusogenität des HIV-Hüllproteins ((Hong, Klein et al. 2009)).

Um zusätzlich die Fusogenität der verwendeten Partikel zu erhöhen, wurde in der Folge mit der Markierung durch MLV.Env gearbeitet. Aus der vorherigen Studie von Marko Lampe ((Lampe, Briggs et al. 2007)) war bekannt, dass die Verwendung der beiden viralen Marker MA.eGFP und mCherry.Vpr zu einer effizienten Doppelmarkierung der Viren von 95% führte. Es gibt in diesem Koexpressionssystem also nur wenige Viren ohne MA-Markierung. Daher wurde im Falle der Pseudotypen das MA-Signal als Referenz für die Partikel gewählt. Es fanden sich neben den doppelt markierten Partikeln etwa genauso viele punktierte, nur mit fluoreszierendem Hüllprotein markierte Strukturen. Da es sich aus dem oben genannten Grund vermutlich nur um Vesikel handelt, wurden diese nicht in den Analysen

berücksichtigt. Da die virale Protease als Gag-Pol in Viren inkorporiert wird, sollten sich in Gag-negativen Partikeln auch keine Protease finden. Vesikel ohne Protease können aber inkorporierte Hüllproteine nicht prozessieren. Die Hüllproteine bleiben daher nicht fusogen. Dass unprozessierte Hüllproteine nicht zur Färbung der Zellen beitragen, bestätigte sich durch den fehlenden Farbübertritt der protease-negativen Partikel auf die Zielzellen (Abb. 3.13). Wie die protease-negativen Partikel sollten auch Env-tragende Vesikel (ohne andere Virusproteine) keine Fusion zeigen können. Bei der Doppelmarkierung von matrixmarkierten Partikeln mit MLV.Env gibt es keinen klaren Übergang in der Fluoreszenzintensität zwischen der Population Env-unmarkierter und -markierter Partikel. Die Unterscheidung zwischen markierten und unmarkierten Partikeln wurde daher mit einem Minimum-Signal-zu-Rausch-Verhältnis vorgenommen. Der Anteil der tatsächlich pseudotypisierten Viren war vermutlich höher als der so ermittelte Wert. Um ein Farbtrennungseignis sicher bestimmen zu können, muss die initiale Markierung beider Fluoreszenzmarkierungen wenigstens in der Nähe eines Signal-Rausch-Verhältnisses von 3 liegen.

Auf andere Partikeleigenschaften, wie die Prozessierung von Gag, hatte die Verwendung dieses Hüllproteins keine Auswirkung.

4.2 Charakterisierung des Versuchsaufbaus zur Partikelanalyse

Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, Virus-Zell-Interaktionen und -Fusionen zu detektieren, wurde ein besonderes Verfahren angewandt. Anstelle adhärente Zellen mit Viren zu inkubieren, wurden sie zuerst mittels Fibronectin an die Glasoberfläche gebunden, die Zellen zugegeben und die Aufnahme zu dem Zeitpunkt gestartet, als die ersten Zellen den Boden des Deckglases berührten. Vorteile dieses Verfahrens sind:

- Viele Viren können von Beginn der Messung an beobachtet werden.
- Der Beginn der Virus-Zell-Interaktionen ist synchronisiert (mit der Ankunft der Zellen an der Fibronektinschicht).
- Einer bestimmten Zelle kann die Zahl der mit ihr interagierenden Viren individuell zugeordnet werden.
- Die Reduktion der Virus-Zell-Interaktion auf die Unterseite der Zellen ermöglicht den Einsatz der deutlich sensitiveren Mikroskopiertechnik Totale Internale Reflektions-Mikroskopie (TIR-FM).

Diese Vorteile erlauben, die Virus-Zell-Interaktionen präzise zu quantifizieren. Die Menge der Viren, mit der eine Zelle interagiert, konnte bestimmt und mit der Zahl der beobachteten Fusionsereignisse verglichen werden. Es ist zwar möglich, einzelne Partikel während der Beobachtung zu verlieren (beispielsweise durch Ablösen vom Boden, oder während der Zellinteraktion durch Aktin-vermittelte laterale Bewegung der Partikel entlang der Zelloberfläche aus der Fokusebene ((Lehmann, Sherer et al. 2005))). Dies betrifft aber nur eine Minderheit aller Partikel. Bei den konventionellen Herangehensweisen wird das Virus in den Überstand von zuvor ausgesäten Zellen gegeben. Die Interaktion solcher Viren beginnt an einer nicht definierten Stelle der Zelloberfläche. Daher muss das gesamte Volumen der Zelle mit Schnittbildaufnahmen erfasst werden. Dafür werden mehrere Aufnahmen gemacht, wobei zwischen jeder einzelnen Messung die Fokusebene meist um weniger als einen Mikrometer verändert wird. Auf diese Weise ist es möglich die Gesamtheit der Zelle in allen drei Raumdimensionen zu erfassen. Dieser Vorgang ist mit der bisher verfügbaren Technik relativ langsam. Werden solche Beobachtungen an Konfokal-Mikroskopen durchgeführt, wird das schwache Partikelsignal durch das Pinhole zusätzlich verringert, was Belichtungszeit und damit Messzeit, Bleichen des Fluorophors und Phototoxizität erhöht. So durchgeführte Studien erreichen derzeit ein zeitliches Auflösungsvermögen von etwa zwei Bildern pro Minute. Ist der Viruseintritt ebenfalls langsam, stellt die Zeitauflösung kein Hindernis dar. Für die HIV-Hüllprotein vermittelte Fusion wird aus Bulk-Experimenten mittels Zell-Zell-Fusion eine Virus-Zell-Interaktionsphase ohne Fusion von etwa 30 Minuten beschrieben, worauf innerhalb der folgenden Stunde die Fusion abgeschlossen wird ((Gallo, Puri et al. 2001); (Gallo, Finnegan et al. 2003)). Als Ursache werden die nötige Anreicherung von Rezeptoren und Hüllproteinen an der Membrankontaktstelle sowie eine langsame Kinetik in den Konformationsänderungen im Hüllprotein vermutet. Für die virale Fusion auf Einzelpartikelebene werden aber auch sehr viel schnellere Kinetiken im Bereich von Sekunden angegeben (HIV: (Markosyan, Cohen et al. 2005); Influenza: (Lakadamyali, Rust et al. 2003), VSV-G: (White 2003)). Sollte es sich bei der Fusion also um einen schnellen Prozess handeln, der sich innerhalb von Sekunden vollzieht, wäre die Aufnahme von Schnittbildern zu langsam für eine Detektion der Fusionsereignisse. Vor allem aber ist die Erfassung und Zuordnung der einzelnen Fluoreszenzsignale aus verschiedenen Zeitpunkten zu einem Virus eindeutiger, wenn die Zeitabstände kurz sind und damit die örtliche Verschiebung

bzw. Signalintensitätsänderung des Virus noch eine Wiedererkennung des Partikels zum nächsten Zeitpunkt erlauben.

Um auszuschließen, dass die Vorbindung an Fibronectin die Fusion der Viren entscheidend beeinflusst, wurde die Transduktionseffizienz von gebundenen und ungebundenen Viren miteinander verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die Vorbindung die Fusion nicht inhibiert (Abschnitt 3.5). Trotzdem könnte der Eindringweg entscheidend verändert worden sein, da das Partikel für die Endozytose komplett von der Fibronectinschicht gelöst werden muss, während sich eine Fusionspore an der Plasmamembran öffnen kann, auch wenn das Virus auf der zur Zelle abgewandten Seite der Partikelmembran noch an Fibronectin gebunden ist. Dies wurde mit Hilfe der Bestimmung der Eindringkompetenz von ungebundenen und freien Viren untersucht. Durch die Verwendung des VSV-G wird ein endozytoseabhängiger Viruseintritt vermittelt. Es konnte kein Unterschied in der Fusionseffizienz zwischen den freien und den vorgebundenen VSV-G pseudotypisierten Viren ermittelt werden (Ergebnisse 3.5). Daher sind die Adhäsionskräfte an die Fibronectinschicht offensichtlich nicht verhindernd für die Endozytose. Gleichwohl ist eine Veränderung der Kinetik nicht ausgeschlossen, da der β -Lactamase-Versuch eine Inkubation von 6 h beinhaltet. Durch die Verwendung der Hüllproteine MLV.Env bzw. HIV.Env, von denen angenommen wird, dass sie vornehmlich an der Plasmamembran fusionieren (z.B. HIV: (Pelchen-Matthews, Clapham et al. 1995), (Maddon, McDougal et al. 1988), MLV: (Matsuyama, Delos et al. 2004)), konnte keine Beeinträchtigung der Fusion durch Fibronectin festgestellt werden. Unter den gewählten Versuchsbedingungen zeigten sich also keine feststellbaren Beeinträchtigungen im Viruseintritt. Einem Ziel in der Virus-Mikroskopie, beobachtete virale Ereignisse direkt mit der später infizierten Zelle zu verbinden und damit deren Relevanz auf Einzelpartikelebene festzuhalten, ist dieses System derzeit näher, als die herkömmliche Mikroskopie von frei diffundierenden Viren.

Eine häufig angewandte Methode, die virale Fusion auf ein bestimmtes Zeitintervall zu beschränken und damit beobachtbar zu machen, sind Temperatursprung-Experimente. Dabei wird ausgenutzt, dass eine Membranfusion bei niedrigen Temperaturen wie 4°C nicht stattfindet. Also werden die Viruspartikel bei 4°C an die Zielzellen gebunden. Die Fusion wird dann durch schnelles Erwärmen (z.B. mittels eines Mediumwechsels mit 37°C warmem Medium) ausgelöst. Ein solches Vorgehen

wurde auch hier mit MLV.Env pseudotypisierten Viren versucht. Es zeigte sich jedoch, dass schon die leicht detektierbare durch Fusion hervorgerufene Membranfärbung der Zelle (siehe auch Abb. 3.13) deutlich verzögert auftrat. Dies deutet darauf hin, dass die Zellhomöostase durch den Temperaturwechsel so beeinträchtigt wird, dass in den ersten Minuten nach Temperaturerhöhung keine oder nur wenige Fusionen möglich sind (siehe auch Abb. I.1). Ursachen auf Seiten der Zelle könnten z.B. eine bei niedrigen Temperaturen ausgelöste Aktindepolymerisierung sein ((Pardee and Spudich 1982)) sowie eine mögliche Umverteilung der zellulären Rezeptoren, sodass sie der Fusionsreaktion nicht mehr zur Verfügung stehen ((Gallo, Finnegan et al. 2003)). Demnach stellt die Verwendung dieses Synchronisationsverfahrens für die Mikroskopie und die Analyse kurzer Zeiträume nach Temperatursprung keinen Vorteil dar.

4.3 Plasmamembranfusion auf Einzelpartikelebene

Ein Defizit in allen derzeit etablierten Systemen, Virusfusion auf Einzelpartikelebene zu messen, ist die schlechte Verknüpfung zwischen der mikroskopischen Beobachtung (Farbtrennung) und der Interpretation (produktive Fusion). Viele der erhobenen Daten sprechen dafür, dass (wie erwartet) Fusion doppelt markierter Partikel zu einer Farbtrennung führt. So legt die Membranfärbung der Zellen (Abb. 3.13) nahe, dass die Partikel an einem Punkt durch Fusion das Hüllprotein verlieren, welches sich dann in der Plasmamembran verteilt. Die Plasmamembranfärbung trat bei der Verwendung der Protease negativer Partikel nicht auf, was die Fusionsabhängigkeit dieser Färbung belegt. Unter der Annahme, dass punktierte Strukturen mit MLV.Env-Signal ohne Signal innerer HIV-Proteine auch sonst kein HIV-Protein enthalten (also einfache Vesikel darstellen) können diese nicht zu der Membranfärbung beitragen. Schließlich fehlt auch ihnen die Protease, das Env-Protein ist daher nicht fusogen (siehe auch 4.1). Die Aufnahme über Endozytose ist zwar möglich, stellt aber für die Plasmamembranfärbung keinen relevanten Faktor dar (Ergebnisse 3.12).

Die Einführung der Mutation H8R sollte zu einer Arretierung der Fusion auf der Ebene der Hemifusion führen ((Zavorotinskaya, Qian et al. 2004)). Da Partikel, die das Hüllprotein mit dieser Mutation tragen, keine Plasmamembranfärbung in rezeptorpositiven Zellen verursachen, kann der erwartete Übertritt des

Membranmarkers erst mit Vollendung der Fusion und nicht schon während der Hemifusion erfolgen (siehe auch Abb. 3.13). Dass Partikel mit dieser Mutation (im Vergleich zu den Wildtyppartikeln) deutlich seltener ein Env-Signalverlust während der Partikel-Zell-Inkubation zeigen, fand sich auch auf Einzelpartikelebene wieder (Abb. 3.14 und 3.15). Hemifusion ist demnach nicht ausreichend einen Hüllproteinübertritt von Partikel- auf Zellmembran zu erreichen. Dies stellt einen wichtigen Unterschied zu Fusionsexperimenten mit DiD als Membranmarker dar. Dort erfolgte der Signalverlust bereits im Moment der Hemifusion ((Melikyan, Markosyan et al. 2000)).

Während der Virus-Zell-Interaktion nahm die Anzahl punktierter Env-Strukturen mit der Zeit stark ab. Dagegen verringerte sich die Anzahl der punktierten MA-Strukturen über die Zeit nur gering. Auch hier korrelierte der Verlust des Membranmarkers mit der Fusogenität des Systems: der Virus mit Hüllprotein ohne Fusionseinschränkung verlor sein Hüllprotein sehr schnell, während protease-negative Partikel sowie Partikel mit dem H8R-mutierten Hüllprotein nur einen geringen Verlust an hüllproteinpunktierten Signalen gegenüber den MA-Signalen zeigten. Der beobachtete Verlust in diesen Kontrollen ist am ehesten durch unspezifische Effekte, wie z.B. Bewegungen aus der Fokusebene heraus, zu erklären. In diesen Fällen kann es passieren, dass das MA-Signal noch als punktiertes Signal erkannt wird, das im Vergleich zum MA-Fluoreszenzsignal relativ schwache Env-Signal im Zellhintergrund aber nicht mehr detektiert wird.

Auch das Quenchen des pH-abhängigen YFP-Signals im azidifizierten Endosom kann zu einem unspezifischen Signalverlust führen. Um diesen Effekt als Grund für den Verlust des Env-Signals auszuschließen, wurde die Veränderung der Viruspopulation auch in Gegenwart von Ammoniumchlorid durchgeführt. Dieses verhindert speziell das Ansäuern der Lysosomen. Da Ammoniumchlorid keinen erkennbaren Einfluss auf die Veränderungen in der Partikelpopulation hatte, ist das pH-bedingte Quenchen als Grund für die Verringerung des doppelt markierten Partikelanteils in den fusogenen Partikeln ausgeschlossen. Zusätzlich legt der geringe Unterschied zwischen den Messungen mit und ohne Ammoniumchlorid nahe, dass der beobachtete unspezifische Abfall des Signals ebenfalls nicht auf Quenchen des Env-Signals zurückzuführen ist (zumindest größten Teils nicht). Im andern Fall hätte der Env-Signal-Verlust bei Ammoniumchloridgegenwart um den

Betrag des Env-Signalverlusts in den Kontrollen (z.B. protease-negativer Partikel) verringert sein müssen.

Trotz der geringen Zeitauflösung war es in mehreren Fällen möglich, doppelt markierte Viren über die Zeit sicher zu identifizieren und zu beobachten. So konnte beobachtet werden, dass ein und dasselbe Partikel von einem Zeitpunkt zum anderen vom doppelt markierten Zustand in einen einfarbigen – nur mit der MA markierten – Zustand wechselte. Dies verdeutlicht, dass tatsächlich die Fusion einzelner Viren die Anfärbung der Plasmamembran verursachte. Bereits bei dieser geringen Zeitauflösung von einem Bild pro Minute zeigte sich, dass eine Fusion auf Einzelpartikelebene als Farbtrennung beobachtet werden kann.

Eine pH-unabhängige Fusion im Endosom wurde in letzter Zeit als Haupteintrittsweg für einige Retroviren diskutiert ((Miyachi, Kim et al. 2009)) und konnte als Farbtrennung auf Einzelpartikelebene detektiert werden. Anders als an der Plasmamembran kommt es aufgrund der Größe eines Endosoms nicht zu einem Signalverlust, sondern zu einer Farbtrennung. Die Endosomenmembran bleibt nach der Fusion in der Fluoreszenz der Virusmembran gefärbt sichtbar ((Miyachi, Kim et al. 2009)). Ein solches Ereignis wurde in diesem Datensatz mit MLV.Env nur einmal detektiert und ist damit nicht relevant. Zumindest scheint in diesem experimentellen Aufbau (MLV.Env an Endothelzellen) die endosomale Virusfusion ein sehr seltener oder nicht vorhandener Eintrittsweg für das Partikel zu sein. Eine Kombination der Eintrittswege, wie in der Studie von Miyachi et al., 2009 für HIV.Env propagiert⁶, kann hier nicht als Erklärung für die Farbtrennungseignisse dienen. Die Verwendung der Env-Mutante H8R, welche die Fusion in der Hemifusion anhält, zeigt, dass dies für die MLV.Env vermittelte Fusion nicht gilt.

Das Hüllprotein des MLVs bedingt vermutlich bereits eine effektive Fusion an der Plasmamembran. Auch mit der verwendeten Zelllinie wurde schon MLV-Fusion an der Plasmamembran beschrieben ((Sherer, Lehmann et al. 2003)). Es gibt aber auch MLV.Env Studien zur pH-unabhängigen Fusion. In anderen Virus-Zell-Systemen wurde beschrieben, dass die Häufigkeit der Endozytose gegenüber der direkten Fusion von dem verwendeten Zelltyp und der dortigen Rezeptordichte abhängen ((Freed 1998), (Chou 2007)). So wurde gezeigt, dass schon die Konzentration des Rezeptors an der Zelloberfläche zwischen Endozytose und Plasmamembranfusion

⁶ Miyachi et al. beschreiben produktive Fusionen von HIV.Env-Partikeln in Endosomen. Die dort beobachteten Fusion an der Plasmamembran wird allerdings

entscheiden kann ((Chou 2007)). Auch andere zelluläre Kofaktoren können bei der Membranfusion eine Rolle spielen. Dynamin 2 wird z.B. eine wichtige Funktion bei der Fusionsporenbildung zugesprochen ((Miyauchi, Kim et al. 2009)). Die Konzentration oder Lokalisation könnten sich in diesen Zellen stark voneinander unterscheiden. Daher könnte die Verwendung anderer Zelllinien bei gleichem Hüllprotein-Rezeptorpaar ein anderes Ergebnis für den bevorzugten Eintrittsweg des Virus ergeben. Vermutlich sind viele Viren zu einem gewissen Grad flexibel in ihrem Eindringverhalten ((Brandenburg and Zhuang 2007), (Marsh and Helenius 2006)).

Dass die detektierten Farbtrennungseignisse auf Einzelpartikelebene tatsächlich mit den für die Infektion verantwortlichen Fusionen übereinstimmen, kann nicht endgültig beantwortet werden. Dazu wäre die Beobachtung nicht nur der viralen Strukturproteine während der Fusion nötig, sondern eine Beobachtung von der Fusion, über die Integration des Virusgenoms in das Wirtsgenom, bis hin zur Expression viraler Proteine. Dies auf Einzelpartikelebene zu leisten, ist derzeit technisch nicht durchführbar.

Außerdem kann eine infizierte Zelle mehrere Fusionen pro zeigen. Zwar existieren diverse Mechanismen z.B. des HI-Virus um eine Superinfektion zu verhindern. Diese greifen aber vermutlich erst nach der erfolgten Integration nicht schon während früherer Prozesse. Für HIV-1 ist die Zahl der Zellen mit eingedrungenen Viren größer als die Zahl infizierter Zellen ((Daecke, Fackler et al. 2005)). So waren hier beispielsweise in ca. fünfmal so vielen Zellen Viren eingedrungen, wie am Ende infiziert waren. Nicht jedes gebildete Viruspartikel ist eindringkompetent und nicht jedes eindringkompetente Virus ist auch tatsächlich infektiös ((Daecke, Fackler et al. 2005)). Es ist auch bekannt, dass zelluläre Abwehrmechanismen, so genannte Restriktionsfaktoren, eine Infektion verhindern können. So bindet z.B. Trim5 α an das virale CA und hemmt das *uncoating* ((Stremlau, Owens et al. 2004)). Die Infektion der Zelle wird dabei erst nach der Fusion verhindert. Eine größere Menge an Virusprotein ist aber in der Lage, solche Restriktionsfaktoren zu neutralisieren. Daher könnte das Eindringen mehrerer Partikel pro Zelle eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Infektion sein (Zusammengefasst in: (Bieniasz 2004)), was sich bis jetzt allerdings nicht eindeutig belegen ließ. Die Verbindung eines einzelnen Fusionsereignisses mit einer erfolgreichen Infektion ist daher von vornherein schwer möglich.

Trotzdem korreliert die Häufigkeit der detektierten Farbtrennung mit der gemessenen Infektivität im verwendeten System (siehe Abb.3.10 zusammen mit 3.13, 3.14 und 3.15). Dies ist ein Hinweis, dass die beobachteten Fusionsereignisse zur Infektion führen.

4.4 Kinetik der Fusion

Die Membranfusion ist je nach Virus unterschiedlich. In *in vitro* Experimenten mit VSV-G in Liposomen beispielsweise bedarf es nur weniger Minuten, um zwei Membranen miteinander zu verschmelzen ((Matsuo, Chevallier et al. 2004)). Die Fusion präsynaptischer Vesikel mit der Plasmamembran der Zelle zur Freisetzung von Neurotransmitter ist ebenfalls sehr schnell ((Bennett and Kearns 2000)). Der Fusionsablauf könnte zwischen Viren und Zellen allerdings komplex und langwierig sein. So bewegen sich die Fusionzeit von Zellen transfiziert mit HIV-Rezeptoren bzw. Hüllprotein zwischen 5 min und 1 h (z.B. (Gallo, Finnegan et al. 2003)). Dies kann unter anderem an den physikalischen Eigenschaften der Fusionspartner liegen, die sich durch Größe und Membrankurvatur deutlich von Liposomen unterscheiden ((Gallo, Finnegan et al. 2003)). In Einzelpartikelexperimenten wurde eine mittlere Zeit bis zur Fusion von 15 min ermittelt (wobei dies die Zeit zur Endozytose einschloss ((Miyachi, Kim et al. 2009)). Vermutlich liegt die Ursache für die verzögerte Fusion in der komplexeren Stöchiometrie der HIV-Fusion. So bedarf es Zeit, bis die erforderliche Menge an Rezeptor und Korezeptor an der Partikelbindungsstelle angereichert ist. Auch die erforderlichen Konformationsänderungen in Rezeptor und Hüllprotein benötigen Zeit.

In dieser Studie wurde das Hüllprotein von MLV verwendet. Die Zeit bis zur ersten gefundenen Fusion nach Zellkontakt betrug weniger als eine Minute. Die schnelle Kinetik des MLV Hüllproteins könnte mit ein Grund für die hohe Fusogenität gegenüber dem HIV-Hüllprotein sein. In der Änderung der Viruspopulation über die Zeit war ersichtlich, dass die Fusion kontinuierlich während des Zellkontakts stattfindet. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass innerhalb der ersten 5 min die Zellen sich auf der Oberfläche noch ausbreiten, sich bis dahin also die Anzahl an Viren, die mit einer gegebenen Zelle interagieren noch erhöht. Daraus ergibt sich die höchste Wahrscheinlichkeit für die Fusion eines MLV-Hüllprotein tragenden Virus für die ersten Minuten des Zellkontakts.

Obwohl die Zeitauflösung der in dieser Arbeit durchgeführten Mikroskopie über einer Sekunde lag, trat der Farbverlust meistens nicht von einem Bild zum anderen auf. Es fand sich vielmehr ein mehrere Sekunden dauernder Abfall vom doppelt markierten zum einfach markierten Zustand. Daraus ergeben sich die Fragen: Welcher Prozess während der Fusion bedingt die Farbtrennung und was stellt die Übergangsphase zwischen den beiden Zuständen dar? Die wahrscheinlichste Erklärung ist, dass (wie hier angenommen) der Membranfarbverlust des Partikels erst nach der Öffnung der Fusionspore erfolgt. Der Abfall der Intensitätskurve stellt die Verdünnung des Membranmarkers in den vereinigten Membranen dar. Dies hängt neben der lateralen Diffusion innerhalb der Membranen z.B. auch von der Fusionsporengröße und der initialen Markierungsdichte des Partikels ab. Es ist daher nicht möglich, aus dem Intensitätsabfall Rückschlüsse auf den Fusionsmechanismus vor der Porenöffnung zu ziehen.

Für kinetische Aussagen kann man allerdings die Zeit bis zum Beginn der Fusionsporenöffnung heranziehen. Sie fasst alle vorherigen Schritte zusammen, beginnend mit der Adhäsion des Partikels, der Rezeptorbindung, einer möglichen Rezeptorrekrutierung und den nötigen Konformationsänderungen, bis sich eine Fusionspore öffnen kann. Hier wurde die minimale Zeit zwischen dem ersten Zellkontakt und der ersten Fusionsporenöffnung mit etwa 30 s bestimmt. Da zwischen Bedeckung durch die Zelle und physischem Kontakt von Virus und Zelle nicht unterschieden werden kann, handelt es sich um eine Obergrenze für die Fusionsporenöffnung mit MLV Hüllprotein in DFJ-8 Zellen. Der Fusionsprozess hängt vermutlich neben Rezeptor- und Hüllproteinkonzentration auch von anderen zellulären Faktoren ab, ist also Zelltyp-abhängig. Dies spiegelt sich auch in den unterschiedlichen Eintrittswegen von HIV-1 in Makrophagen und T-Zellen wider ((Freed 1998)). Es könnte daher auch die Zeit, bis sich eine Fusionspore an der Plasmamembran öffnet, in anderen Zelltypen variieren. Derzeit wird die Öffnung der Fusionspore als der geschwindigkeitslimitierende Schritt während der Fusion angesehen ((Melikyan 2008)). Könnte man die Zeit der Adhäsion genauer in allen Fusionsereignissen bestimmen und annehmen, dass die anderen Schritte mit einer ungleich höheren Geschwindigkeit ablaufen als die Fusionsporenöffnung, entspräche die mittlere Zeit ausgehend vom Binden bis zur Fusion, der Zeit für die Fusionsporenöffnung.

4.5 Häufigkeit der Fusion

Das System der MLV.Env pseudotypisierten Partikel wurde gewählt, um die hohe Fusogenität dieses Hüllproteins auszunutzen. Diese hohe Fusogenität war in den ersten Experimenten auch klar erkennbar (siehe z.B. Abb. 3.10, 3.13, 3.14). Dort waren etwa 50 % aller punktierten Hüllproteinsignale nach 20 min verschwunden, während in den fusionsinkompetenten Partikeln nur 5 % der punktierten Hüllproteinstrukturen zum MA-Signal verloren gingen. Es sollten in diesem Zeitraum also 45 % aller Partikel fusioniert sein. In den späteren Experimenten mit hoher Zeitauflösung auf Einzelpartikelebene wurden dagegen nur 28 Fusionsereignisse aus 21.000 beobachteten Partikeln gefunden (Abschnitt 3.9), was 0,13 % der Partikel entspricht. Dieser scheinbare Widerspruch zwischen den beiden Experimenten erklärt sich vermutlich wie folgt:

Zuerst war die Beobachtungszeit zwischen den beiden Experimenten mit 6 bzw. 20 min unterschiedlich. Es hätten in dieser Zeit also nur 7 % der Partikel fusionieren sollen (Abb. 3.15, Differenz des Env-Signalverlusts der MLV.Env Partikel und der bei Hemifusion arretierten MLV.Env H8R Partikel). Die Bedingungen für die Aufnahmen waren allerdings deutlich unterschiedlich zwischen den beiden Experimenten. So konnten die Belichtungs- und Detektionszeiten in den Experimenten mit nur einem Bild pro Minute verdoppelt werden, ohne eines der Signale stark durch Bleichen zu beeinträchtigen. Daher waren viele der Partikel in den Experimenten mit hoher Zeitauflösung zu schwach in der Hüllproteinmarkierung, um einen Farbverlust sicher zu detektieren. Obwohl Viruspartikel aus der gleichen Charge verwendet wurden, war die Anzahl doppelt markierter Partikel also aufgrund einer erhöhten Detektionsschwelle scheinbar geringer. 95 % der von der Software als Farbverlust erkannten Partikel konnten daher nicht berücksichtigt werden, was die erwartete Ereignisrate auf 0,35 % reduzierte. Der letzte Faktor (von 0,35 % auf 0,13 %) ist mit dem erhöhten Bleichen in diesen Experimenten mit hoher Zeitauflösung zu erklären. Für relativ schwach markierte Partikel kann ein echter Farbverlust nicht vom Bleichen der Partikel unterschieden werden. Diese müssen daher unberücksichtigt bleiben. Wahrscheinlich finden deutlich mehr Fusionen statt als hier detektiert. Bei geringer Zeitauflösung ist es derzeit aber nicht möglich, sie sicher von einem unspezifischen Signalverlust wie Bleichen zu unterscheiden. Dazu wäre eine weitere Verbesserung

des Messsystems nötig. So erleichtert bereits der Ersatz des Env.YFPs durch eine mCherry markierte Variante die Arbeit und den Nachweis erheblich. Auch die Verwendung organischer Fluorophore wie den Atto- oder Alexa- Farbstoffen kann den Nachweis von Fusionsereignissen erleichtern. Diese könnten entweder mit einem Markierungssystem wie dem bereits vorgestellten SNAP-Tag in das Partikel eingeführt werden oder mit einer zufälligen Oberflächenmarkierung durch Fluorophore gekoppelt reaktive Gruppen wie den NHS-Estern. Ein solches Vorgehen hat zumindest im Fall des Vesikuläres Stomatitis Virus zum Erfolg geführt ((Cureton, Massol et al. 2009)).

4.6 MA und andere Virusmarker

Während der Etablierung des Systems zur Detektion von Fusionsereignissen stellte sich die Frage nach der Eignung der MA als Fusionsindikator. Dies war mit ein Grund für Verwendung von MA markierten Partikeln, pseudotypisiert mit fluoreszierendem MLV.Env.YFP. Das Hüllprotein ist ein transmembranes Glykoprotein und bleibt nach der Fusion an der Membran zurück. Das MA Protein ist zumindest im unreifen Zustand mit einem Myristylanker in der Innenseite der Membran verankert. Die Erwartung war, dass die kombinierten membranassoziierten Marker beide während der Fusion vom Viruskern verschwinden und an der Membran zurückbleiben. Die ersten Experimente mit dem markierten Env.YFP als Fusionsmarker zeigten jedoch, dass MA als punktierte Struktur nach der Fusion erhalten blieb, im Gegensatz zum Hüllprotein, das sich während der Inkubationszeit über die Plasmamembran der Zelle verteilte. Auch die Zahl der Partikel mit alleinigem MA-Signal nahm mit der Zeit deutlich zu, während die Zahl der doppelt markierten (Env und MA) Partikel abnahm. Das Auffinden der Farbtrennungseignisse mit Env und MA markierten Partikeln legte nahe, dass zumindest ein Teil der MA-Schicht für eine gewisse Zeit als punktförmige Struktur nach der Fusion erhalten bleibt. Dabei wurde das MA-Signal in manchen Fällen zwar kurz nach der Fusion verloren, in den meisten Fällen blieb es aber bis zu vier Minuten nach der Fusion nachweisbar. MA könnte weiter mit dem Kern des Virus – zumindest für einen kurzen Zeitraum – assoziiert bleiben. In den Fusionsexperimenten mit dreifarbigem Partikeln scheint sich diese Annahme zu bestätigen (Anhang II). Zwar ist mit 5 Fusionsereignissen mit dreifarbigem Partikeln die Zahl noch sehr gering, trotzdem ist bisher keine Trennung von MA und dem

Kernsignal an der Integrase beobachtet worden. Es scheint sich um den vorherrschenden Typ der Fusionsereignisse in diesem System (MLV.Env-vermittelte Fusion an der Plasmamembran in nicht humanen Epithelzellen) zu handeln. Ob es sich hierbei um den einzigen Eintrittsweg handelt bzw. um den, der auch später zur Infektion der Zelle führt, kann derzeit nicht beantwortet werden (siehe auch 4.3). In den Daten zur Fusion mit MA und MLV.Env doppelt markierten Partikeln gibt es Partikel, deren Signale beide von einer Aufnahme zur nächsten verschwinden. Die Ereignisse in denen beide Farben gleichzeitig verloren gingen, waren insgesamt kaum häufiger als die sequenziellen Farbtrennungereignisse (45 Ereignisse gegen 28) und kamen – wenn auch seltener – in Messungen mit fusionsdefizienten Partikeln vor. Das deutet darauf hin, dass ein Teil dieser doppelten Signalverlustereignisse von unspezifischen Effekten herrührte (wie plötzliche Dissoziation eines Partikels von der Glasoberfläche durch endosomale Partikelaufnahme).

Auch das Verhalten der verwendeten viralen Kernmarker wie Integrase und Vpr deutet darauf hin, dass sich ein Großteil der MA-Struktur wie der Viruskern verhält. So fanden sich keine Unterschiede in den Populationsänderungen während der Virus-Zell-Interaktion zwischen den MA- und den Vpr- Markern. Mit einer instabileren MA-Struktur hätte man erwartet, dass die Steigung in der Abbildung 3.15 (Verhältnis Env/Innerer Virusmarker mit der Zeit) der MA-Partikel flacher als die der anders markierten Partikel verläuft. Dies war aber für beide verwendeten inneren Partikelmarker nicht der Fall. In MLV.Env pseudotypisierten HIV-Partikeln und Epithelzellen aus dem Huhn verhält sich die MA wie der mit Vpr oder IN markierte Viruskern.

MA vermittelt die Bindung von Gag an die Plasmamembran und ist damit während der Virusassemblierung für die Lokalisation von Gag an die Plasmamembran verantwortlich ((Zhou, Parent et al. 1994)). Die Direktion zur Plasmamembran wird durch den Myristylanker am N-Terminus, eine membranbindende basische Aminosäureansammlung und eine Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-Bindestelle in der MA hervorgerufen ((Tang, Loeliger et al. 2004)). Die Bindungsaffinität der MA im Vergleich zu ungespaltenem Gag ist jedoch deutlich geringer ((Saad, Miller et al. 2006)) Dies liegt an einem regulierten Umklappen der Acylkette des Myristylankers und der verminderten Multimerisierung der MA gegenüber Gag ((Tang, Loeliger et al. 2004), (Dalton, Ako-Adjei et al. 2007)). Entsprechend wird MA in reifen Partikeln

durch Behandlung mit Detergenzien vom Kern des Partikels innerhalb der ersten Sekunden abgelöst. Allerdings wurde die MA mit HIV-Cores in Zellen detektiert ((Welker, Hohenberg et al. 2000), (Accola, Ohagen et al. 2000), (Kotov, Zhou et al. 1999)), wobei die Mengen verglichen mit dem intakten Partikel eher gering sind ((Cullen 2001), (Miller, Farnet et al. 1997)). Man kann also erwarten, dass die Mehrheit der MA-Moleküle nach der Fusion schnell vom Viruskern als Monomere oder kleine Oligomere abfällt. Diese Umverteilung stimmt mit den zuvor mit MA und Vpr markierten VSV-G Pseudotypen erhobenen Daten überein. Nach 2 Stunden Inkubation waren dort ein diffuses zytoplasmatisches MA-Signal und ein am Zellkern befindliches Vpr-Signal beobachtet worden (Lampe, Briggs et al. 2007). Dies ist weniger betont mit den verwendeten MLV-Pseudotypen. Hier wird der Großteil der MA nicht umverteilt, sondern verbleibt als punktierte Struktur im Zytosol sichtbar. Eine mögliche Erklärung für diesen Phänotyp wäre der Verbleib der MA-Schicht an der Fusionsstelle, während sich das Hüllprotein in der Membran ausbreitet und der Partikelkern ins Zytosol gelangt. Allerdings gibt es derzeit keinen experimentellen Hinweis, dass die MA-Schicht nach der Fusion intakt bleibt. Auch die beobachtbaren schnellen, vermutlich Mikrotubuli assoziierten Bewegungen der punktförmigen MA-Strukturen und das Zusammenbleiben der MA und der Integrase nach Fusion der dreifarbig markierten Partikel sind mit diesem Bild nicht vereinbar. Alternativ kann sich die MA-Struktur von der Membran lösen und wird dann mit dem Viruskern eine Zeit vielleicht bis zur Formung des Präintegrationskomplexes weiter transportiert. Der Verlust der Membranbindung wäre mit dem Affinitätsverlust der MA im reifen Partikel zu erklären. Ein Modell für die Wechselwirkung von Kern und MA-Schicht existiert derzeit nicht. Eine Erklärung könnten aber auch fehlende Kofaktoren für den Ablösungsprozess der MA vor dem *uncoating* sein. Einerseits könnten die langen zytoplasmatischen Enden des HIV-Hüllproteins eine wichtige Funktion für die Abtrennung der MA vom Partikel haben. Andererseits könnten zelluläre Kofaktoren für das *uncoating* in dem verwendeten Zelltyp fehlen oder nicht auf die gewünschte Weise mit dem Viruskern interagieren. Diese Vorstellung passt nicht zu den derzeitigen Modellen des *uncoatings*. Man geht davon aus, dass die Fähigkeit für ein effizientes *uncoating* des Partikels in der Struktur des reifen Partikels liegt. So sollte nach dem Wegfall der Membran die Struktur des zuvor inneren Partikelteils labil sein und von selbst zerfallen und so den folgenden Schritt, die reverse Transkription und das Formen des Präintegrationskomplexes ermöglichen. Hier wäre ein Modell nötig,

welches das *uncoating* der Viren auf Einzelpartikelebene in Abhängigkeit von zellulären Faktoren zeigt. Die in den letzten Jahren durchgeführten *siRNA-knock-down-screens* haben potentielle zelluläre Faktoren identifiziert, die für eine effiziente Infektion wichtig sind, das Eindringen des Virus per se aber nicht verhindern. Diese würden ihre Effekte hauptsächlich in allen zwischen Fusion und Integration liegenden Schritten haben. Ein interessanter Kandidat für weitere Untersuchungen wäre auch das bisher als Endozytoseinhibitor verwendete Dynasore. Dieser inhibiert Dynamin II, scheint aber noch andere Effekte zu haben. So wurde berichtet, dass die Inhibierung mit Dynasore das Öffnen der Fusionspore verhindert ((Miyachi, Kim et al. 2009)).

4.8 Bewegungsassoziiierung der Partikel

Die Virus-Zellinteraktion stellt für das Virus mit der Bindung an einen Rezeptor einerseits und dem Zugang zu der zellulären Transportmaschinerie einen Wechsel zwischen bestimmten Bewegungsformen dar. Die erste Bindung stellt im Normalfall den Übergang von einer freien Diffusion in einen immobilen Zustand oder zumindest in eine stark eingeschränkte Diffusion dar. Diese kann allerdings schon vor Internalisierung in eine gerichtete, aktinvermittelte Bewegung – auch Surfing genannt – übergehen ((Lehmann, Sherer et al. 2005)). Nach Internalisierung ist eine stark eingeschränkte Diffusion, aber vor allem ein motorvermittelter Transport, der sowohl aktin- als auch mikrotubulivermittelt sein kann, möglich. Das Bewegungsverhalten der Partikel kann daher Aufschluss über die Lokalisation eines Partikels innerhalb einer Zelle geben.

Im Fall der vorgebundenen Partikel ist die erste Interaktion der Zellen mit einem Virus durch dessen Übergang aus einem unbewegten in einen bewegten Zustand möglich. Etwa die Hälfte aller Partikel zeigte während der gesamten Messung keine Bewegung. Es gab 16 Partikel, deren erste erkennbare Zell-Interaktion bereits die Fusion mit der Zelle war. Sie blieben zwar bis zu diesem Moment bewegungslos, gingen dann aber in eine gerichtete Bewegung über. Dies unterstreicht, dass die fluoreszenzmarkierten Virusstrukturen internalisiert wurden. Nach der Fusion steht einem Virus das gesamte Transportsystem der Zelle zur Verfügung. Partikel bewegten sich daher zum einen relativ langsam (vermutlich eine aktinvermittelte Bewegung) aber auch schnell und daher eher mikrotubulivermittelt.

Langsame Bewegung kann durchaus vor der Fusion stattfinden. Ein Großteil der beobachteten Viren, unabhängig ob sie später fusionierten oder nicht, band zuerst an die Zelloberfläche, was daran zu erkennen war, dass sie sich mit einer langsamen Geschwindigkeit in der Ausbreitungsrichtung der Zelle bewegten. Meist handelte es sich um mehrere Partikel mit sehr ähnlichen Bewegungsrichtungen und Geschwindigkeiten. Vermutlich war dafür die Bewegung der Zelle verantwortlich und die Partikel wurden passiv mitbewegt. Auch ein Membranfluss, besonders an Filopodien und anderen Zellfortsätzen ist eine mögliche Ursache. Bei 12 der Fusionsereignisse trat schon vor der Fusion eine gerichtete, von anderen Partikeln oder der Zelle unabhängige Bewegung auf. Aufgrund ihrer Geschwindigkeit handelte es sich vermutlich um aktinvermittelte Bewegung. Dies legt den Schluss nahe, dass es sich um das Surfen der Partikel an der Oberfläche der Zelle handelt. Dieses wird vermutlich durch die Zusammenführung der Rezeptoren durch die Partikelbindung verursacht. Die Rezeptoren stellen wiederum direkt oder indirekt mit ihrer zytoplasmatischen Seite einen Kontakt zu Aktin her, welches über Myosine von der Peripherie zum Zellkörper gezogen wird und dadurch die Rezeptoren mitzieht. Dieser Effekt ist nicht auf Viren beschränkt, sondern kommt auch nach Bindung von natürlichen Liganden an Rezeptoren vor ((Lidke, Lidke et al. 2005)).

Aus dem Bewegungsverhalten kann also folgendes geschlossen werden: Partikel interagieren mit der Zelle. Diese Interaktion ist stärker als die Adhäsion dieser Partikel an der Fibronektinschicht. Neben der langsamen, gerichteten Bewegung die durchaus auch an der Zelloberfläche stattfindet, verbindet das Auftreten schneller, gerichteter Bewegung (katalysiert durch Aktin oder Mikrotubuli) nach einer Farbtrennung diese mit einer Internalisierung der Virusstruktur. Dies ist neben der Farbtrennung ein weiterer Indikator für die stattgefundene Fusion.

5. Ausblick

In dieser Arbeit ist es gelungen, die retrovirale Fusion fluoreszenzmikroskopisch auf Einzelpartikelebene darzustellen. Dazu wurden pseudotypisierte Viren erzeugt, deren hohe Fusogenität die Detektion von Farbtrennungseignissen ermöglicht. Gleichzeitig wurde mit dem Aussäen der Zellen auf Viren eine Methode zur quantitativen Erfassung der Virus-Zell-Interaktion eingeführt, durch die sehr akkurat der Zeitpunkt und die Anzahl von Interaktionen angegeben werden kann.

In Zukunft wird es darum gehen, einzelne Viren nach der Fusion weiter zu verfolgen und die Limitationen des derzeitigen Versuchsaufbaus zu überwinden. Bisher wurden die Aufnahmen auf den unteren Teil der Zellen, in dem die initiale Virus-Zell-Interaktion stattfindet, beschränkt. Um einen Virus von der Fusion bis zum Transport in den Nukleus zu verfolgen, muss die gesamte Zelle in z-Schichten erfasst werden, um das Virus bei seinem Weg durch das Zytosol nicht zu verlieren. Dies geht auf Kosten der zeitlichen Auflösung. Um dieses Defizit möglichst gering zu halten, muss auf ein neues, auf schnelle z-Schichtaquirierung ausgerichtetes Mikroskopiesystem gewechselt werden. Dies könnte das Vorlegen der Viren auf Fibronectin erübrigen. Außerdem müssen innere Fluoreszenzmarker, die möglichst lange mit dem viralen Genom assoziiert bleiben, verwendet werden. Die Integrase stellt dabei sicher das geeignete virale Protein dar und ist bereits in dieser Arbeit eingeführt worden. Derzeit wird versucht, mit Hilfe von MLV pseudotypisierten Partikeln die Translokation der Integrase aus fusionierten Partikeln in den Kern zu verfolgen. Um die Formierung eines PICs nach Fusion zu gewährleisten, musste allerdings das zugrunde liegende HIV-Konstrukt gewechselt werden.

Um die biologische Relevanz der Messungen zu erhöhen, wird in Zukunft wieder mit nicht pseudotypisierten HIV-Partikeln gearbeitet werden. Für den viralen Membranmarker werden derzeit verschiedene Strategien getestet. Neben dem hier bereits eingeführten GPI.SNAP werden unter anderem verschiedene Verfahren zur HIV-Hüllproteinmarkierung erprobt.

Anhang I: Synchronisierung der Virusfusion mittels T-Shift-Experimenten

I.1 Methode

5×10^3 DFJ-8-Zellen wurden in gekammerten Deckgläsern ausgesät. Für 4°C-Vorbindung wurden die Deckgläser 24 h nach Aussaat für 30 min auf Eis gestellt. 100ng (p24-ELISA) MLV.Env.YFP pseudotypisierte MA.mCherry positive Zellen wurden zu den Zellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Deckgläser wurden vom Eis genommen und sofort das Medium (200 µl/Kammer) durch frisches, auf 37°C vorgewärmtes Medium ersetzt. Deckgläser wurden weiter auf 37°C warmen Metallblock im Zellinkubator inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0 min, 5 min, 15min wurden die Zellen mit 3%igem PFA fixiert und die Verteilung der YFP-Fluoreszenz in den Zellen mit z-Schichtaufnahmen im Mikroskop aufgenommen.

I.2 Ergebnis

Als mögliche Synchronisierungsmethode wurde in der Vergangenheit Virus bei niedriger, die Fusion inhibierenden Temperatur an Zellen vorgebunden. Durch Mediumwechsel wurde die Temperatur rasch erhöht und die nun nicht mehr inhibierte Fusion untersucht. Hier wurde das Vorbinden bei 4°C mit MLV.Env.YFP markierten Viren getestet. Durch Mediumwechsel mit 37°C warmem Medium wurde die Temperatur erhöht. Die Zunahme des diffusen zellulären YFP-Fluoreszenzsignals diente als Auswertung. Als Vergleich wurden parallel Viren ohne 4°C-Vorbindung auf Zellen gegeben.

15 min nach T-Erhöhung bzw. Viruszugabe zeigte sich, dass die Membranfärbung in Zellen mit vorgebundenem Virus geringer war als in frei diffundierenden Viren (Abb. I.1).

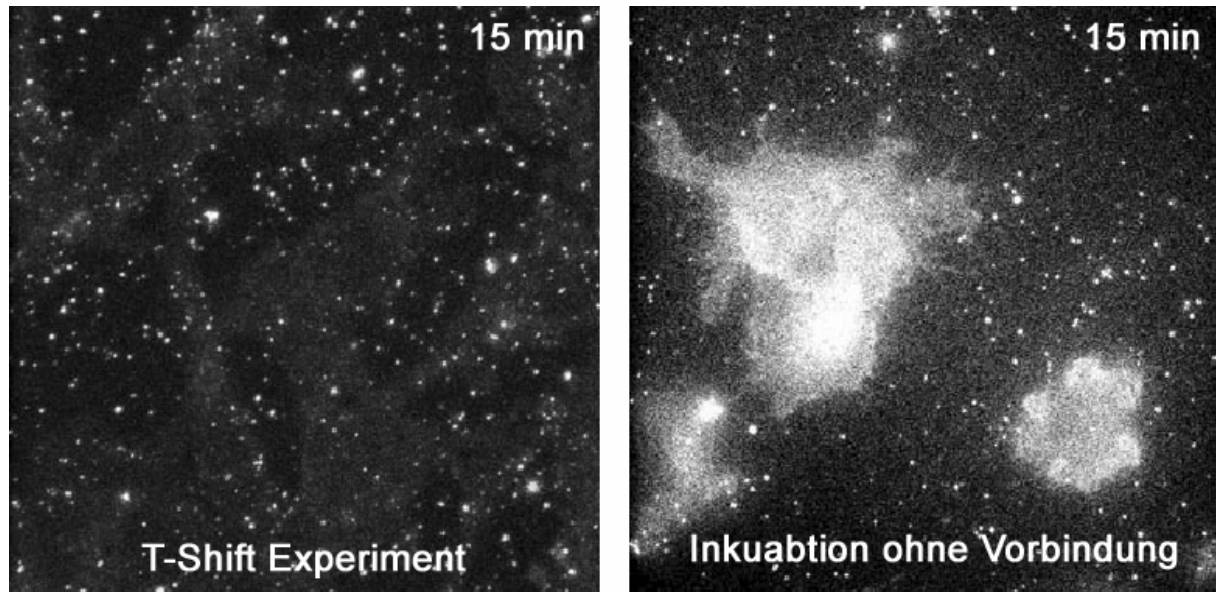


Abb. I.1: Vergleich von T-Shift Experiment und normaler Viruszell-Interaktion.

DFJ-8 Zellen wurden mit 100 ng MLV.Env.YFP pseudotypisierten HIV-Partikeln inkubiert. Die Viruspartikel wurden auf Eis an die ausgesäten Zellen für 30 min vorgebunden. Durch einen Mediumwechsel mit 37°C warmem DMEM wurde Fusion ermöglicht (links). Alternativ wurden die Zellen direkt ohne Verbindung mit der gleichen Menge Virus inkubiert (rechts). Nach 15 min Virus-Zellinteraktion bei 37°C wurde der Viruseintritt in beiden Ansätzen anhand der aufgetretenen Zellfärbung verglichen.

Anhang II: Dreifachmarkierte Partikel für Eintrittsexperimente

II.1 Methode

II.1.1 Partikelproduktion

Partikel wurden durch Dreifachtransfektion mit den Plasmiden kodierend für MA.CFP, MLV.Env.mCherry, Vpr.IN.eGFP und HIV.Env(-) in den gleichen Verhältnissen wie für die Produktion der jeweiligen zweifachmarkierten Partikel verwendet (4:1:0.8:1). Die Partikel wurden 36 h nach der Transfektion geerntet.

II.2 Ergebnisse

II.2.1 Dreifachmarkierung:

Die Markierung wurde wie bei den doppeltmarkierten Partikeln mittels ImageJ analysiert. Es ergab sich eine Dreifachmarkierungseffizienz von 15%. Dies war eine geringe Menge an dreifachmarkierten Partikeln. Um die Wahrscheinlichkeit Farbtrennungseignisse eines dreifachmarkierten Partikels zu erhöhen, wurde im Folgenden *live cell imaging* mit einer 40fachen Vergrößerung ausgeführt.

II.2.2 *Live cell imaging* mit dreifach markierten Partikeln

Wie in den vorigen Experimenten wurden die Partikel an Fibronectin vorgebunden und DFJ-8 Zellen auf diesen ausgesät. Die Trajektorien der Partikel unter den Zellen wurden mit der Trackingsoftware auf die gleiche Weise analysiert. Insgesamt wurden 5 Farbtrennungseignisse mit dreifachmarkierten Partikeln detektiert (Abb. II.1 und CD-Filme 11-14).

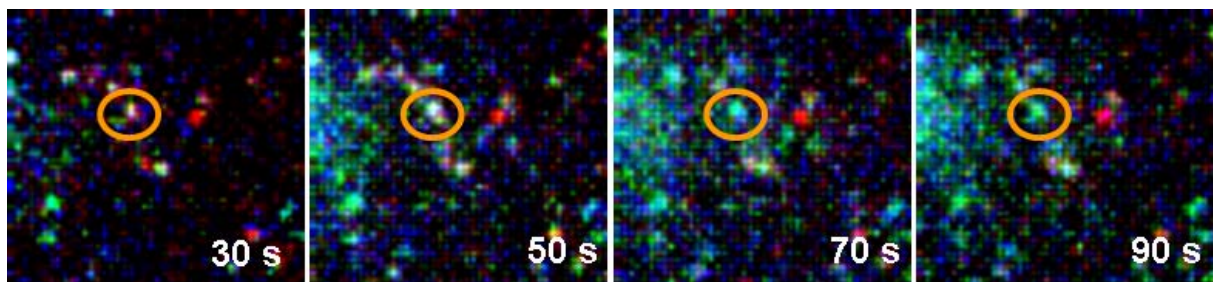


Abb.II.1: Verhalten von dreifach markierten Partikeln: IN.eGFP, Env.mCherry und MA.CFP dreifachmarkierte Partikel wurden auf einem Fibronectinbeschichteten Deckglas immobilisiert und DFJ-8 Zellen darüber ausgesät. Die Aufnahme erfolgte mit einer Frequenz von 0.4 Bildern / Sekunde und wurde mit dem Beginn der Adhäsion der Zelle an das Deckglas begonnen. Bildaufnahmen entsprechen den angegebenen Zeitpunkten nach Zell-Viruskontakt und wurden mit Hilfe des Programms ImageJ ausgezählt. Dargestellt sind die Env.YFP (rot) bzw. IN.eGFP (grün) und MA.CFP (blau) entsprechenden Fluoreszenzkanäle.

II.2.3 Westernblot zur Partikelanalyse

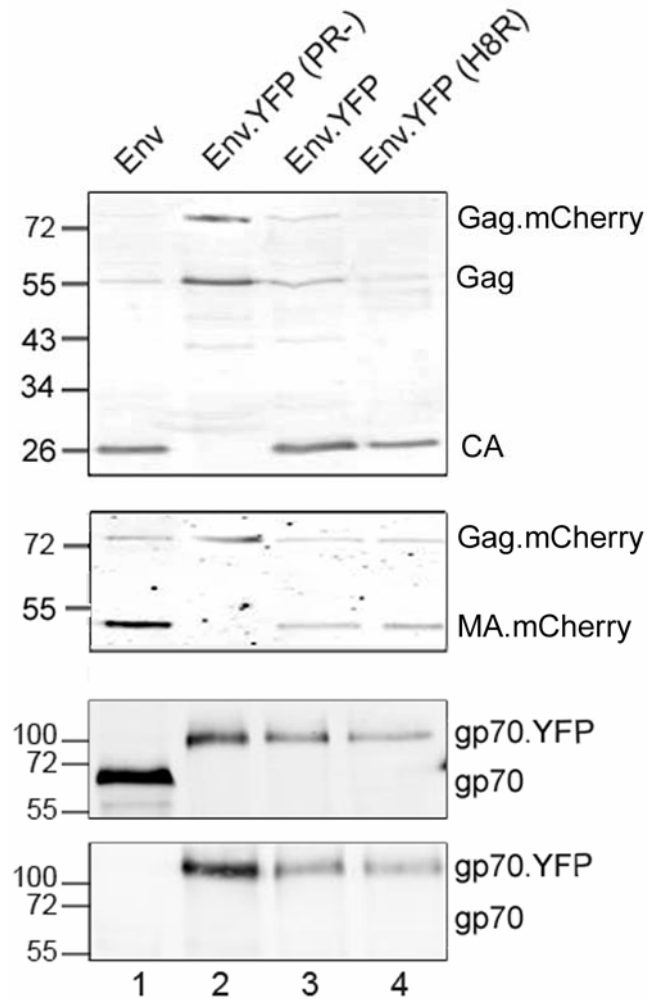


Abb. II.2.2: Immunoblot Analyse von aufgereinigten Partikeln. pCHIV.mCherry gefärbte Partikel, pseudotypisiert mit der angezeigten Env-Variante wurden mittels Zentrifugation durch Sucrosekissen von einer 293T Kokultur aufgereinigt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE (12.5 % Acrylamid) aufgetrennt, nach der im Methodenteil beschriebenen Standardmethode auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Proteine wurden mittels des quantitativen Immunoblotsystems von LiCor mit den folgenden Antiseren bestimmt: anti CA (oberste Zeile); anti mCherry (zweite Zeile); anti gp70 (dritte Zeile); anti GFP (unterste Zeile). Die Position des molekularen Massenstandards wird links angezeigt (in kDa).

Literaturverzeichnis:

- Accola, M. A., A. Ohagen, et al. (2000). "Isolation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Cores: Retention of Vpr in the Absence of p6^{gag} ." J. Virol. 74: 6198-6202.
- Adamson, C. S. and E. O. Freed (2007). "Human immunodeficiency virus type 1 assembly, release and maturation. " Adv. Pharmacol. 55: 347-387.
- Albanese, A., D. Arosio, et al. (2008). "HIV-1 Pre-Integration Complexes Selectively Target Decondensed Chromatin in the Nuclear Periphery." PLoS one 3(6): e2413.
- Alimonti, J., T. Ball, et al. (2003). "Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS." J Gen Virol 84(7): 1649-1661.
- Arhel, N. J., S. Souquere-Besse, et al. (2007). "HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore." EMBO J. 26: 3025-3037.
- Bennett, M. R. and J. L. Kearns (2000). "Statistics of transmitter release at nerve terminals." Progress in Neurobiology 60(6): 545-606.
- Benting, J., A. Rietveld, et al. (1999). "Acyl and alkyl chain length of GPI-anchors is critical for raft association in vitro." FEBS Letters 462(1-2): 47-50.
- Bieniasz, P. D. (2004). "Intrinsic immunity: a front-line defense against viral attack." nature immunology 5(11): 1109-1115.
- Bohne and H. G. Krausslich (2004). "Mutation of the major 5' splice site renders a CMV-driven HIV-1 proviral clone tat dependent: connection between transcription and splicing." FEBS Lett 563(1-3):113-8.
- Booth, A. M., Y. Fang, et al. (2006). "Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane." Journal of Cell Biology 172 (6): 923-935.
- Brandenburg, B. and X. Zhuang (2007). "Virus trafficking - learning from single-virus tracking." Nat Rev Micro 5(3): 197-208.
- Brügger, B., B. Glass, et al. (2005). "The HIV lipidome: A raft with an unusual composition." PNAS.
- Bukrinsky, M. (2004). "A Hard Way to the Nucleus." Mol. Med. 10: 1-5.
- Bukrinsky, M., S. Haggerty, et al. (1993). "A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells." Nature 365: 666-669.
- Bushman, F. D., A. Engelman, et al. (1993). "Domains of the integrase protein of human immunodeficiency virus type 1 responsible for polynucleotidyl transfer and zinc binding." Proc. Natl Acad. Sci USA 90: 3428-3432.
- Campbell, E. M., O. Perez, et al. (2008). "Visualization of a proteasome-independent intermediate during restriction of HIV-1 by rhesus TRIM5a." Journal of Molecular Biology 180 (3): 549-561.
- Campbell, E. M., O. Perez, et al. (2007). "Labeling HIV-1 virions with two fluorescent proteins allows identification of virions that have productively entered the target cell." Virology 360(2): 286-293.
- Charneau, P., M. Alizon, et al. (1992). "A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication." Journal of Virology 66(5): 2814-2820.
- Cherepanov, P. and e. al. (2003). "HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells." J. Biol. Chem. 278: 372-381.
- Cherepanov, P., G. Maertens, et al. (2008). "HIV-1 Integrase Forms Stable Tetramers and Associates with LEDGF/p75 Protein in Human Cells." J. Biol. Chem. 278(1): 372-381.
- Chou, T. (2007). "Stochastic Entry of Enveloped Viruses: Fusion versus Endocytosis." Biophys. J. 93: 1116-1123.
- Chow, S. A., K. A. Vincent, et al. (1992). "Reversal of integration and DNA splicing mediated by integrase of human immunodeficiency virus." Science 255: 723-726.
- Coffin, J. M., S. H. Hughes, et al. (1997). "Retroviruses." Cold Spring Harbor Laboratory Press: 105.

- Conner, S. D. and S. L. Schmid (2003). "Regulated portals of entry into cells." *Nature* 422: 37-44.
- Connor, R., B. Chen, et al. (1995). "Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes." *Virology* 206(2): 935-944.
- Coyne, C. B. and J. M. Bergelson (2006). "Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions." *Cell* 124: 119-131.
- Cullen, B. R. (2001). "Journey to the Center of the Cell." *Cell* 105(6): 697-700.
- Cureton, D., R. Massol, et al. (2009). "Vesicular Stomatitis Virus Enters Cells through Vesicles Incompletely Coated with Clathrin That Depend upon Actin for Internalization." *PLoS Pathogens* 5(4): e1000394.
- Daecke, J., O. T. Fackler, et al. (2005). "Involvement of clathrin-mediated endocytosis in human immunodeficiency virus type 1 entry." *J. Virol.* 79: 1581-1594.
- Dalton, A., D. Ako-Adjei, et al. (2007). "Electrostatic interactions drive membrane association of the human immunodeficiency virus type 1 Gag MA domain. ." *J. Virol.* 81(12): 6434-45.
- Damm, E. M. (2005). "Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae." *J. Cell Biol.* 168: 477-488.
- de Noronha, C., M. Sherman, et al. (2001). "Dynamic disruptions in nuclear envelope architecture and integrity induced by HIV-1 Vpr." *Science* 294(5544): 1105-1108.
- Deman, J. J., L. C. Vakaet, et al. (1976). "Cell Size and Mutual Cell Adhesion." *J. Membrane Biol.* 26: 189-204.
- Dohner, K. and B. Sodeik (2005). "The role of the cytoskeleton during viral infection." *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 285: 67-108.
- Dong, X., H. Li, et al. (2005). "AP-3 directs the intracellular trafficking of HIV-1 Gag and plays a key role in particle assembly." *Cell* 120: 663-674.
- Dupont, S., N. Sharova, et al. (1999). "A novel nuclear export activity in HIV-1 matrix protein required for viral replication." *Nature* 402(6762): 681-685.
- Dvorin, J. D. and M. H. Malim (2003). "Intracellular Trafficking of HIV-1 Cores: Journey to the Center of the Cell." *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*: 179-208.
- Ellens, H., J. Bentz, et al. (1985). "H⁺- and Ca²⁺-induced fusion and destabilization of liposomes." *Biochemistry*: 6978-6987.
- Emi, N., T. Friedmann, et al. (1991). "Pseudotype formation of murine leukemia virus with the G protein of vesicular stomatitis virus." *Journal of Virology* 65(3): 1202-1207.
- Fackler, O. T. and B. M. Peterlin (2000). "Endocytic entry of HIV-1." *10*(16): 1005-1008.
- Fassati, A. and S. P. Goff (2001). "Characterization of Intracellular Reverse Transcription Complexes of Human Immunodeficiency Virus Type 1." *Journal of Virology* 75(8): 3626-3635.
- Fauquet, C., M. Mayo, et al. (2005). "Virus Taxonomy: The Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses." San Diego, CA: Elsevier Academic Press(1162 pp).
- Fisher, A., M. Feinberg, et al. (1986). "The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication." *Nature* 320(6060): 367-371.
- Fitzon, T., B. Leschonsky, et al. (2000). "Proline residues in the HIV-1 NH₂-terminal capsid domain: structure determinants for proper core assembly and subsequent steps of early replication." *Virology* 268: 294-307.
- Flint, S., L. E. LW, et al. (2004). "Principles of virology." ASM Press. Washington D.C.
- Forshey, B. M., U. von Schwedler, et al. (2002). "Formation of a human immunodeficiency virus type 1 core of optimal stability is crucial for viral replication. ." *J Virol* 76(11): 5667-5677.
- Fouchier, R. A. and e. al. (1998). "Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein with the nuclear pore complex." *J. Virol.* 72: 6004-6013.
- Franke, E. K., H. E. Yuan, et al. (1994). "Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. ." *Nature* 372(6504): 359-362.

- Freed, E. (1998). "HIV-1 Gag Proteins: Diverse Functions in the Virus Life Cycle." *Virology* 251(1): 1-15.
- Gallo, S., A. Puri, et al. (2001). "HIV-1 gp41 Six-Helix Bundle Formation Occurs Rapidly after the Engagement of gp120 by CXCR4 in the HIV-1 Env-Mediated Fusion Process." *Biochemistry* 40(41): 12231- 12236.
- Gallo, S. A., C. M. Finnegan, et al. (2003). "The HIV Env-mediated fusion reaction." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1614(1): 36-50.
- Godinez, W. J., M. Lampe, et al. (2009). "Deterministic and probabilistic approaches for tracking virus particles in time-lapse fluorescence microscopy image sequences." *Medical Image Analysis* 13(2): 325-342.
- Goff, S. P. (2003). "Genetics of Retroviral Integration." *Annual Review of Genetics* 26(1): 527-544.
- Greenwald, J., V. Le, et al. (1999). "The mobility of an HIV-1 integrase active site loop is correlated with catalytic activity." *Biochemistry* 38: 8892-8898.
- Gummuluru, S. and M. Emerman (1999). "Cell cycle- and Vpr-mediated regulation of human immunodeficiency virus type 1 expression in primary and transformed T-cell lines." *J Virol* 73(7): 5422-5430.
- Harrison, S. C. (2008). "Viral membrane fusion." *Nat Struct Mol Biol* 15(7): 690-698.
- Hong, S., E. A. Klein, et al. (2009). "Fibrils of Prostatic Acid Phosphatase Fragments Boost Infections with XMRV (Xenotropic Murine Leukemia Virus-Related Virus), a Human Retrovirus Associated with Prostate Cancer." *J. Virol.* 83(14): 6995-7003.
- Hrimech, M., X. Yao, et al. (1999). "Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr functions as an immediate-early protein during HIV-1 infection." *J Virol* 73(5): 4101-4109.
- Jenkins, Y., P. V. Sanchez, et al. (2001). "Nuclear export of human immunodeficiency virus type 1 Vpr is not required for virion packaging." *J. Virol.* 75(17): 8348-8352.
- Kayman, S., H. Park, et al. (1999). "The hypervariable domain of the murine leukemia virus surface protein tolerates large insertions and deletions, enabling development of a retroviral particle display system." *J Virol* 73: 1802-1808.
- Kemble, G. W., T. Danieli, et al. (1994). "Lipid-anchored influenza hemagglutinin promotes hemifusion, not complete fusion." *Cell* 76(2): 383-391.
- Keppler, A., M. Kindermann, et al. (2004). "Labeling of fusion proteins of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase with small molecules in vivo and in vitro." *Methods* 32(4): 437-444.
- Kotov, A., J. Zhou, et al. (1999). "Association of Nef with the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Core." *J. Virol.* 73(10): 8824-8830.
- Kwong, P. D., R. Wyatt, et al. (1998). "Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody." *Nature* 393: 648-659.
- Lakadamyali, M., M. J. Rust, et al. (2003). "Visualizing infection of individual influenza viruses." *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100: 9280-9285.
- Lampe, M. (2007). "Analyse der frühen Schritte der HIV-1-Zell-Interaktion mittels Echtzeit-Fluoreszenzmikroskopie." Heidelberg. PhD: 156.
- Lampe, M., J. A. G. Briggs, et al. (2007). "Double-labelled HIV-1 particles for study of virus-cell interaction." *Virology* 360(1): 92-104.
- Lehmann, M. J., N. M. Sherer, et al. (2005). "Actin- and myosin-driven movement of viruses along filopodia precedes their entry into cells." *J. Cell Biol.* 170: 317-325.
- Leventis, R., J. Gagné, et al. (1986). "Divalent cation induced fusion and lipid lateral segregation in phosphatidylcholine-phosphatidic acid vesicles." *Biochemistry*: 6978-6987.
- Li, E., D. Stupack, et al. (1998). "Adenovirus endocytosis requires actin cytoskeleton reorganization mediated by Rho family GTPases." *Journal of Virology* 72: 8806-8812.
- Li, L., J. M. Olvera, et al. (2001). "Role of the non-homologous DNA end joining pathway in the early steps of retroviral infection." *EMBO J.* 20(12): 3272-3281.

- Lidke, D. S., K. A. Lidke, et al. (2005). "Reaching out for signals: filopodia sense EGF and respond by directed retrograde transport of activated receptors." *J. Cell Biol.* 170(4): 619-626.
- London, E. (2002). "Insights into lipid raft structure and formation from experiments in model membranes." *Current Opinion in Structural Biology* 12(4): 480-486.
- Lu, M., S. Blacklow, et al. (1995). "A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein." *Nat. Struct. Biol.*: 1075-1082.
- Maddon, P. J., J. S. McDougal, et al. (1988). "HIV infection does not require endocytosis of its receptor, CD4." *Cell* 54: 865-874.
- Mahender, S. (2006). "No vaccine against HIV yet-are we not perfectly equipped?." *Virology Journal*: 10.1186/1743-422X-3-60.
- Markosyan, R. M., F. S. Cohen, et al. (2000). "The Lipid-anchored Ectodomain of Influenza Virus Hemagglutinin (GPI-HA) Is Capable of Inducing Nonenlarging Fusion Pores." *Mol. Biol. Cell* 11(4): 1143-1152.
- Markosyan, R. M., F. S. Cohen, et al. (2003). "HIV-1 Envelope Proteins Complete Their Folding into Six-helix Bundles Immediately after Fusion Pore Formation." *Mol. Biol. Cell* 14(3): 926-938.
- Markosyan, R. M., F. S. Cohen, et al. (2005). "Time-resolved imaging of HIV-1 Env-mediated lipid and content mixing between a single virion and cell membrane." *Mol. Biol. Cell* 16: 5502-5513.
- Marsh, M. and R. Bron (1997). "SFV infection in CHO cells: cell-type specific restrictions to productive virus entry at the cell surface." *J. Cell Sci.* 110: 95-103.
- Marsh, M. and A. Helenius (2006). "Virus entry: open sesame." *Cell* 124: 729-740.
- Matsuo, H., J. Chevallier, et al. (2004). "Role of LBPA and Alix in Multivesicular Liposome Formation and Endosome Organization." *Science* 303(5657): 531-534.
- Matsuyama, S., S. Delos, et al. (2004). "Sequential roles of receptor binding and low pH in forming prehairpin and hairpin conformations of a retroviral envelope glycoprotein." *J. Virol.* 78: 8201-8209.
- McCune, J. M., L. B. Rabin, et al. (1988). "Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus." *Cell* 53(1): 55-67.
- McDonald, D., M. A. Vodicka, et al. (2002). "Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells." *J. Cell Biol.* 159(3): 441-452.
- Melikyan, G. B. (2008). "Common principles and intermediates of viral protein-mediated fusion: the HIV-1 paradigm." *Retrovirology* 5(1): 111-124.
- Melikyan, G. B., R. J. Barnard, et al. (2005). "Imaging individual retroviral fusion events: from hemifusion to pore formation and growth." *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102: 8728-8733.
- Melikyan, G. B., R. J. O. Barnard, et al. (2005). "Imaging individual retroviral fusion events: From hemifusion to pore formation and growth." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(24): 8728-8733.
- Melikyan, G. B., R. M. Markosyan, et al. (2000). "Evidence That the Transition of HIV-1 gp41 into a Six-Helix Bundle, Not the Bundle Configuration, Induces Membrane Fusion." *J. Cell Biol.* 151(2): 413-424.
- Miller, M., C. Farnet, et al. (1997). "Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition." *J. Virol.* 71(7): 5382-5390.
- Miyauchi, K., Y. Kim, et al. (2009). "HIV Enters Cells via Endocytosis and Dynamin-Dependent Fusion with Endosomes." *J. Virol.* 83(3): 433-444.
- Modrow, S., D. Falke, et al. (2003). "Molekulare Virologie." Spektrum Akademischer Verlag: 1-734.
- Muller, B., J. Daেকে, et al. (2004). "Construction and Characterization of a Fluorescently Labeled Infectious Human Immunodeficiency Virus Type 1 Derivative." *J. Virol.* 78(19): 10803-10813.
- Nemerow, G. R. and P. L. Stewart (1999). "Role of alpha(v) integrins in adenovirus cell entry and gene delivery." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 725-734.

- Nguyen, D. H. and J. E. Hildreth (2000). "Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid enriched membrane lipid rafts." *J Virol* 74: 3264-3272.
- Ono, A. and E. Freed (2005). "Role of lipid rafts in virus replication." *Advances in Virus Research* 64: 311-357.
- Pardee, J. and J. Spudich (1982). "Purification of muscle actin." *Methods Enzymol.* 65: 164-181.
- Parton, R. G. and K. Simons (2007). "The multiple faces of caveolae." *Nat Rev Micro* 8: 185-194.
- Pear, W., G. Nolan, et al. (1993). "Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection." *Proc. Natl Acad. Sci USA* 90(18): 8392-8396.
- Pelchen-Matthews, A., P. Clapham, et al. (1995). "Role of CD4 endocytosis in human immunodeficiency virus infection." *J. Virol.* 69: 8164-8168.
- Rocquigny, H. d., P. Petitjean, et al. (1997). "The zinc fingers of HIV nucleocapsid protein NCp7 direct interactions with the viral regulatory protein Vpr." *J. Biol. Chem.* 272(49): 30753-30759.
- Rossmann, M. G., Y. He, et al. (2002). "Picornavirus-receptor interactions." *Trends Microbiology* 10: 324-331.
- Rouzic, E. L. and e. al (2002). "Docking of HIV-1 Vpr to the nuclear envelope is mediated by the interaction with the nucleoporin hCG1." *J. Biol. Chem.* 277: 45091-45098.
- Rust, M. J., M. Lakadamyali, et al. (2004). "Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry." *Nature Struct. Mol. Biol.* 11: 567-573.
- Saad, J. S., J. Miller, et al. (2006). "Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(30): 11364-11369.
- Scherer, W. F., J. T. Syverton, et al. (1953). "Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses: IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix." *J. Exp. Med.* 97(5): 695-710.
- Sei, Y., M. Inoue, et al. (1990). "Characterization of human B cell (DK) and promonocyte (U937) clones after HIV-1 exposure: accumulation of viral reverse transcriptase activity in cells and early syncytia induction against SupT1 cells." *Cell Immunol* 125(1): 1-13.
- Selig, L., J. C. Pages, et al. (1999). "Interaction with the p6 domain of the gag precursor mediates incorporation into virions of Vpr and Vpx proteins from primate lentiviruses." *J. Virol.* 73(1): 592.
- Sena-Esteves, M., Y. Saeki, et al. (1999). "Single-step conversion of cells to retrovirus vector producers with herpes simplex virus-Epstein-Barr virus hybrid amplicon." *Journal of Virology* 73(12): 10426-10439.
- Shaw, J. E., R. F. Epan, et al. (2006). "Correlated Fluorescence-Atomic Force Microscopy of Membrane Domains: Structure of Fluorescence Probes Determines Lipid Localization." *Biophysical Journal* 90(6): 2170-2178.
- Sherer, N. M., M. J. Lehmann, et al. (2003). "Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies." *Traffic* 4: 785-801.
- Skehel, J. and D. Wiley (2002). "Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin." *Annual Review in Biochemistry* 69: 531-569.
- Stewart, P. L., T. S. Dermody, et al. (2003). "Structural basis of nonenveloped virus cell entry." *Advanced Protein Chemistry* 64: 455-491.
- Stremlau, M., C. M. Owens, et al. (2004). "The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys." *Nature* 427: 848-853.
- Tang, C., E. Loeliger, et al. (2004). "Entropic switch regulates myristate exposure in the HIV-1 matrix protein." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(2): 517-522.
- Thali, M., A. Bukovsky, et al. (1994). "Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions." *Nature* 372(6504): 363-365.

- Ugolini, S., I. Mondor, et al. (1999). "HIV-1 attachment: another look." *Trends in Microbiology* 7(4): 144-149.
- van Meer, G., D. R. Voelker, et al. (2008). "Membrane lipids: where they are and how they behave." *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(2): 112-124.
- Vlasak, M., I. Goesler, et al. (2005). "Human Rhinovirus Type 89 Variants Use Heparan Sulfate Proteoglycan for Cell Attachment." *Journal of Virology* 79(10): 5963-5970.
- Welker, R., H. Hohenberg, et al. (2000). "Biochemical and Structural Analysis of Isolated Mature Cores of Human Immunodeficiency Virus Type 1." *J. Virol.* 74(3): 1168-1177.
- Whitcomb, J. M. and S. H. Hughes (2003). "Retroviral Reverse Transcription and Integration: Progress and Problems." *Annual Review of Cell Biology* 8(1): 275-306.
- White, J. M. (2003). "Viral and Cellular Membrane Fusion Proteins." *Annual Review of Physiology* 52(1): 675-697.
- www.aids-sida.com
- www.rki.de/cln
- ["www.rki.de/cln_048/nn_196014/DE/Content/InfAZ/H/HIVAIDS/hiv__aids__wat.html."](http://www.rki.de/cln_048/nn_196014/DE/Content/InfAZ/H/HIVAIDS/hiv__aids__wat.html)
- Young, J. T. Y., D. M. Knipe, et al. (2001). "Virus entry and uncoating." *Fields Virology Fourth Editioneds* (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins), pp. : 87-103.
- Zavorotinskaya, T., Z. Qian, et al. (2004). "A Point Mutation in the Binding Subunit of a Retroviral Envelope Protein Arrests Virus Entry at Hemifusion." *J. Virol.* 78(1): 473-481.
- Zhou, W., L. J. Parent, et al. (1994). "Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids." *J. Virol.* 68(4): 2556-2569.

Abbildungsverzeichnis

Typ	Nr.	Titel	Seite
Abb.	1.1	Das offene Leseraster von HIV	3
Abb.	1.2	Schematische Darstellung eines HIV-Partikels	4
Abb.	1.3	Schematische Darstellung des Replikationszykluses von HIV-1	6
Abb.	1.4	Schematische Darstellung des Myristyl-Switches	9
Abb.	1.5	Verschiedene Arten der Endozytose	14
Abb.	1.6	Darstellung der Fusion	15
Tab.	3.1	Mittleres Signal-zu-Rausch-Verhältnis von mit Lipiden markierten Partikeln	50
Abb.	3.1	Viruspartikel nach Inkubation mit fluoreszenzmarkieren Lipiden	50
Abb.	3.2	Eintrittsversuch mit GM1 markierten Partikeln	51
Abb.	3.3	Plasmamembranfärbung während der Virus-Zellinteraktion	52
Abb.	3.4	Westernblot aufgereinigter Zellüberstände nach Virusproduktion in Gegenwart von GPI.SNAP	55
Tab.	3.2	Signal-zu-Rausch-Verhältnis unter Verwendung von mit Proteinankern markierten Partikeln	55
Abb.	3.5	Eintrittseffizienz von GPI.SNAP-markierten Partikeln	56
Abb.	3.6	Live cell imaging von GPI.SNAP-markierten (A) und mCherry.Vpr markierten (B) HIV Partikeln	57
Abb.	3.7	Signal-zu-Rausch-Verhältnis von MLV.Env.YFP markierten Viruspartikeln	58
Abb.	3.8	Anstieg der Doppeltmarkierung mit Zunahme des Env.YFP	59
Abb.	3.9	Immunoblot Analyse von aufgereinigten Partikeln	62
Abb.	3.10	Infektiösität von VLPs, die an Fibronectin gebunden waren	63
Abb.	3.11	Transduktionseffizienz von ungebundenen und vorgebundenen Viruspartikeln	65
Abb.	3.12	Vergleich der Eintrittseffizienz an Fibronectin gebundener und freier Partikel	66
Abb.	3.13	Plasmamembranfärbung als Resultat der Virus-Zellinkubation mit fluoreszierenden Viren	68
Abb.	3.14	Verlust des Env-Signals in der Partikelpopulation während des Virus-Zellkontakts	70
Abb.	3.15	Farbtrennung von doppelt markierten Partikeln während der Virus-Zellinkubation über die Zeit	71

Abbildungsverzeichnis

Abb.	3.16	Visualisierung der Fusion in Echtzeit	74
Tab.	3.3	Auflistung aller Farbtrennungseignisse mit MA.XFP markierten MLV.Env pseudotypisierten Partikeln	76
Abb.	3.17	Beispieltrajektorien von einzelnen Partikeln, die ein Farbtrennungseignis zeigen	78
Abb.	3.18	Verhalten von mCherry.Vpr markierten Partikeln	79
Tab.	3.4	Zusammenfassung der Trackingergebnisse mit unterschiedlichen Partikeln	81
Abb.	3.19	Abhängigkeit des Fusionszeitpunktes mit der Menge Hüllprotein der MLV.Env pseudotypisierten HIV Partikeln	82
Abb.	I.1	Vergleich von T-Shift Experiment und normaler Viruszell-Interaktion.	104
Abb.	II.1	Verhalten von dreifach markierten Partikeln	105
Abb.	II.2	Immunoblot Analyse von aufgereinigten Partikeln	106

Danksagung

Prof. Dr. Hans-Georg Kräusslich dank ich, dass ich die vorliegende Arbeit unter seiner Betreuung anfertigen zu dürfen. Dank seiner Förderung konnte ich dieses Projekt voran und zu einem Ergebnis bringen. Besonders die Unterstützung in Diskussions- und Formulierungsfragen habe mir sehr weitergeholfen. Auch dass mir die Möglichkeit mich außerhalb des Instituts im Gebiet der Medizin zu engagieren, rechne ich ihm hoch an.

Ich danke Freddy Frischknecht, für die Begutachtung meiner Arbeit und für seine hilfreichen und interessanten Anregungen in meinem PhD-Committee.

Ich danke Dr. Rainer Pepperkok für seine Teilnahme an meinem PhD-Committee, seine Vorschläge und Hilfestellung.

Prof. Dr. Walter Nickel danke ich für Teilnahme an meinem PhD-Committee und seine konstruktive Vorschläge. Ihm und Prof. Dr. Oliver Fackler danke ich für die Betreuung, Kritik und Einbindung in das Graduierten Kolleg GRK 1188.

Ich möchte PD Dr. Barbara Müller für die Unterstützung und die geduldige Korrektur meiner Publikationsentwürfe danke. Ein Großteil des Fundaments dieser Dissertation wird von Ihre Vorarbeit gebildet. Ihre Konstrukte und ihr damit verbundenes Know-how waren für diese Arbeit unverzichtbar.

Mein besonders herzlicher Dank gilt Dr. Maik Lehmann für seine intensive Betreuung und anhaltende Unterstützung. Er hat den Projektteil mit MLV.Env inniziert und mich in Planung sowie Durchführung beraten und unterstützt. Ich danke ihr für die langen, freundschaftlichen Diskussionen über meine Ergebnisse.

Ebenso wichtig war die Einführung und Hilfe von Dr. Marko Lampe. Seine Etablierungsarbeit vieler Methoden und des Mikroskopiesetups sehr wichtig war.

Besonderer Dank gehört auch den Bioinformatikern um Prof. Dr. Karl Rohr, William Godinez und Stefan Wörz, in der Abteilung von Prof. Dr. Roland Eils für die Weiterentwicklung der Tracking-Software sowie die geduldige Beantwortung aller meiner Fragen.

Im Labor von Barbara Müller danke ich Maria Anders, Anke Mareil und Manon Eckhardt für die stete Hilfe, anregende Diskussionen und auch dafür, dass ich einige ihrer Plasmide einsetzen durfte.

Bärbel Glass und Heike Oberwinkler danke ich für die Hilfe im Labor. Maier Lorizate danke ich für ihre Hilfe im experimentellen Umgang mit Lipiden. Für die freundliche Atmosphäre danke ich allen Mitgliedern der Abteilung, besonders den Mikroskopikern PD Dr. Walter Muraniy, Jessica Janus, Nikolas Herold.

Mein herzlicher Dank gilt meiner Familie. Mein Dank gilt Juliane für ihre Geduld und großartige Unterstützung in Schreibfragen.